(2) 公表特許公報(A) (19) 日本国特許庁 (JP)

Ę

特表平8-500010

(11)特許出願公表番号

(43)公表日 平成8年(1996)1月9日

				¥	М	(全 91 頁) <b>最終</b> 頁に続く	
				8	80/	請求 有	
FI				C12N 15/00	u,	予備審査請決	
						10 未翻決	
广内整理番号	9282-4B			9281-4B	7729-4B	整座體決	
數別配号	ZNA C 9282-4B						
	21/02	38/00	38/22				
(51) Int.CI.	C12P	A61K					

	The state of the s		
(21) 出順番号	<b>特膜平6—503745</b>	(71)出職人	(71) 田職人 ルードヴィッヒ・インスティデュート・フ
(86) (22) 田蘭日	平成5年(1993)5月13日		メア・キャンサー・リサーチ
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)11月15日		アメリカ合衆国 ニューヨーク 10105
(86)国際出願番号	PCT/US93/04550		ニューヨーク アベニュー・オブ・ジ・ア
(87)国際公開番号	WO93/23068		メリカズ 1345
(87) 国際公開日	平成5年(1993)11月25日	(72)発明者	ヴァスヴォトン, フレミング, エス
(31)優先権主張番号	07/883, 949		スウェーデン国 エス・751 24 ウブサ
(32)優先日	1992年6月15日		ラ(無器地)
(33)優先権主張国	米回 (NS)	(72) 発明者	(72)発明者 アンダーソン, マリア
(31)優先権主張番号	07/977, 234		スウェーデン国 エス・751 24 ウブサ
(32)優先日	1992年11月16日		ラ (集番地)
(33)優先権主費国	(SA) 題米	(74)代理人	(74)代理人 弁理士 北村 修

最終買に続く

血小板由来の増殖囚子アンタゴニスト (54) [発明の名称]

(57) [要約]

ゴニスト効果に必要である。アンタゴニストをつくる核 酸配列と、その物質に感染した細胞系も記載されてい る。図は、PDGF-AのHPLC実験から溶離された ペプチドのアミノ酸配列を示す。 本発明はPDGFに対するアンタゴニスト (拮抗剤)を セプタを結合するが、結合したレセプタの二量化を阻止 する二量体である。二量化はPDGF効果つまりアンタ 記載している。アンタゴニストはアミノ酸を含み、単量 **体でも二量体でもよい。特に好適なものは、PDGFV** 

FIG. 7B

-#--YVRKKPKLKEVQVRLEEHLECACATTSLNPDYRSE "PAG-G------SIEEAVPAVCKTRTVIYEIPRSQVDPTSANFLIWP PCVEVKRCTGCCNTSSVRCQPSRVHHRSVKVAKVE \*p1---@---#@-----

DIGRPRESGKKRKRKKLKPI

2

# 【特許請求の範囲】

1. 血小板由来の増殖因子に対する、分離されたアミノ酸を含むアンタゴニス

2. PDGFAにもPDGFBにも見いだせないアミノ酸配列からなる相求項 1のアンタゴニスト。 3. アミノ敬配列Ala Asp Phe Leu Val X(Y)n G lu lle Val Arg Lys Lys Proを持ち、ここで、Xは トリプトファンまたは変成トリプトファン残基、Yは任意のアミノ酸、nは0か 535の数である請求項2のアンタゴニスト。

4. アミノ酸配列:

Ala Asn Phe Leu Val X Glu Ile Val

rg Lys Lys Pro

を含み、ここで、Xはトリプトファンまたは変成トリプトファン残基である請求 項1のアンタゴニスト。

- 5. Xがチオアニソール化トリプトファンか2ーニトロフェニルスルフェニル
- 6. 前記アンタゴニストがアミノ酸配列:

誘導体である請求項1のアンタゴニスト。

Ala-Asn-Phe-Leu-Val-X-

Pro-Pro-Cys-Val-Glu-Val-Gln-Leu-Arg-Pro-Val-Gln-Val-Arg-Lys-Ile-Glu-lle-Val-Arg-Lys-Lys-Pro からなり、ここで、Xはトリプトファンまたは変成トリプトファン残基である鞘 求項4のアンタゴニスト。

- 7. Xがチオアニソール化トリプトファンか2ーニトロフェニル塩化スルフェ ニル誘導体である請求項1のアンタゴニスト。
- 8. PDGFレセプタを提示する細胞へのPDGFの結合を阻蓄する方法であ って、前配細胞を含むサンプルに、前配細胞に対するPDGFの結合を阻断する に十分な量の、 請求項1のアンタゴニストを加えることからなるもの。

ල

- 9. いずれかの単量体上のアミノ酸123か、いずれかの単量体上のアミノ酸132の少なくとも一方がシステインでなく、前配変成二量体が野生型PDGFAに対するアンタゴニストである、分離された変成PDGFA上回下S人酸132がシステインでない額求項9の分離された変成PDGFAA二量体。
   10. 一方の単価体上のアミノ酸123と他方の単型体上のアミノ酸132がシステインでない額求項9の分離された変成PDGFAA二量体。
- 11. いずれかの単量体上のアミノ酸124が、いずれかの単量体上のアミノ酸133の少なくとも一方がシステインでなく、前配変成二量体が野生型PDGFBBに対するアンタゴニストである、分離された変成PDGFBI=基体。
   12. 一方の単量体上のアミノ酸124と他方の単量体上のアミノ酸133がシステインでない額求項11の分離された変成PDGFBL量体。
- 13. (1) PDGF Aの単量体またはPDGF Bの単量体、と(11) 非PDGF単量体からなり、前配2つの単量体が1個のジスルフィド結合によってつながれ、前配二量体がPDGFアンタゴニストである、分離された二量体。
- 14. 前記非PDGF単量体が増殖因子である梢求項13の分離された二量体。
- 1 5、前記非P D G F 単置体がV E G F である精求項13の分離された二量体。
- 16. 前記アンタゴニストが二量体である精求項1のアンタゴニスト。
- 17. 前記アンタゴニストが空成PDGF-A分子である鷸末項1のアンタゴニスト
- 前記二量体が1つの変成PDGF-A分子からな

る構求項16のアンタゴニスト。

- 19.前記変成PDGF-A分子がアミノ酸位置156~162で変成されている請求項18のアンタゴニスト。
- 20. 前記変成PDGF-A分子が位置156~162にアミノ酸配列KPHQGQ6を持つ請求項19のアンタゴニスト。
- 21.前記アンタゴニストが変成PDGF-B分子である構求項1のアンタゴニ

22. 前記二量体が1つの変成PDGF-B分子からなる請求項16のアンタゴ

- ニスト。
- 23.前記変成PDGF-B分子がアミノ酸位置156~162で変成されている請求項21のアンタゴニスト。
- 24. 前記変成PDGF-B分子がアミノ酸位置156~162で変成されている精末項22のアンタゴニスト。
- 25. 前記変成PDCF-B分子が位置156~162にアミノ酸配列KPHQCQHを持つ構求項23のアンタゴニスト。
- 26.前記変成PDGF−B分子が位置156~162にアミノ酸配別K PHQ GQHを持つ請求項24のアンタゴニスト。
- 27. いずれかの単量体上のアミノ酸123か、いすれかの単量体上のアミノ酸1320少なくとも一方がシ
- ステインでなく、前記単量体がアミノ酸位置156~162で変成されていることを条件として、前記二量体がPDGF-AA二量体である請求項16の分離されたアンタゴニスト。
- 28. 前記二量体が、前記二量体の2つの単量体をつなぐ1本のシステイン結合 を持っている鯖求項16の分離されたアンタゴニスト。
- 29.前記単量体の一方が変成PDGF-A分子である請求項28の分離された アンタゴニスト。
- 30. 前記変成PDGF-A分子がアミノ酸156~162のところで変成されている間求項29の分雑されたアンタゴニスト。
- 31. 前記変成PDCF-A単重体がアミノ酸位置156~162にアミノ酸KPHQCQHを持つ崩求項30の分離されたアンタゴニスト。
- 32. 前配二重体が1つの変成PDGF-B分子をさらに備えた舗状項18のアンタゴコスト。33. 前配二重体が1つの変成PDGF-B分子をさらに備えた舗状項19のア
- ンタゴニスト。 34.前記二量体が1つの変成PDGF-B分子をさらに備えた絹求項20のア

ンタゴニスト。

# 35. 請求項17のアンタゴニストをコード化する分離

# された核酸配列。

- 36. 精求項19のアンタゴニストをコード化する分離された核酸配列。
- 37. 請求項21のアンタゴニストをコード化する分離された核酸配列。
- 38. プロモーターに作用的に連鎖した請求項35の核酸配列からなる発現ベク
- , \_ &
- 39. プロモーターに作用的に連鎖した請求項37の核酸配列からなる発現ベク
- , K
- 40. プロモーターに作用的に連鎖した構求項36の核酸配列からなる発現ベク
- å\_°
- 41. p S V 7 d P D G F O で表される構求項 4 0 の発現ベクター。
- 42. 間求項35の核酸配列に感染した細胞系
- 43. 前記細胞系が真核細胞系である饋求項42の細胞系。
- 4 4. 前記真核細胞系がCOS細胞系である請求項43の細胞系。

45. 前配細胞系がPDGF-Bを生成する請求項35の細胞系。

- 47. 精求項21のアンタゴニストをコード化する核酸配列に感染した細胞系。
- 48. 前記細胞系がPDGF-Aを生成する簡求項47の細胞系
- 49. 前田御贈系に D D G F -A をコード化する核酸配列に感染した請求項 4 8
- 50. PDGFアンタゴニストの生成に有用なキットであって、それぞれがPDGF単電体をコード化する第1および第2様徴配列の別々の的分からなり、前配PDGF単量体の一方がPDGFレセプタとの結合を阻害するよう変成され、他方のPDGF単量体が在PDGF単量体であるキット。
- 51.前記変成されたPDGF単量体が変成PDGF-Aであり、前記正常なPDGF単量体がPDGF-Bである請求項50のキット。

- 52.前記変成されたPDGF単最体が変成PDCF-Bであり、前記正常なPDGF単量体がでしてF-Aである請求項51のキット。
- 53.前記変成されたPDGF単量体が変成PDGF-Aであり、前記正常なP
- DGF単量体が正常なPDGF-Aである翻求項50のキット。
- 54. 前記変成されたPDGF単量体が変成PDGF--
- Bであり、前記正常なPDGF単量体が正常なPDGF-Bである請求項50のキット。
- 55. PDCF単量体の前記一方がアミノ酸位置156~162で変成されている請求項50のキット。
- 5 6. 患者に対する P D G F B の悪影響を抑制する方法であって、前配患者に
- 、PDCF-Bの悪影響を抑制するに十分な蠢の、錯求項1のアンタゴニストを 投与することからなるもの。
- 57. 前配悪影響が細胞感染である精求項56の方法。
- 58.前記アンタゴニストがPDGF-0Bである舗求項56の方法。
- 59. 残基124および133がシステインでないことを条件として、PDGF
- B 単量体のアミノ酸配列を持った、分離された血小板由来の増殖因子アゴニス・
- 60.残基124および133の少なくとも一方がセリンである請求項59の分 罷された血小板由来の増殖因子アゴニスト。
- 61. 残基124および133の両方がセリンである糖求項59の分離された血小板由来の増強因子アゴニスト。
- 62. 残差12 4 および133がシステインでないことを条件として、 P D G F 4 単量体のアミノ酸配列を
- 持った、分離された血小板由来の増殖因子アゴニスト。
- 63. 残基124および133の少なくとも一方がセリンである請求項62の分離された血小板由来の増殖因子アゴニスト。
- 64. 残基124および133の両方がセリンである請求項62の分離された血

8

**特表平8-500010** 

(1)

小板由来の増殖因子アゴニスト。

- 6 5. 請求項59のアゴニストをコード化する分離された核酸分子。
- 66. 請求項62のアゴニストをコード化する分離された核酸配列。
- 67. 請求項65の分離された核酸配列を含むプラスミド。
- 68. 請求項66の分離された核酸配列を含むプラスミド。
- 69. 1個の分子間ジスルフィド結合を持ったPDGF三量体の産生に有用なキットであって、それぞれがPDGF単量体をコード化する第1および第2核酸配列の別々の部分からなり、前配第1および第2核酸分子の一方が、正常なPDGF単量体の第2および第4システイン部分でシステインをコード化しないよう変成されたもの。
- 70.前記第1および第2核後分子の一方が、正常なPDCF単量体の第2システイン部分でシステインをコード化しないよう変成され、他方の核酸分子が、正常なPDCF単量体の第4システイン部分でシステインをコード化しないよう変成された請求項69のキット。
- 71. 前記第1および第2核酸分子がPDGF Aをコード化する請求項69のキット。
- 72. 前記第1および第2核酸分子がPDGF Bをコード化する離水項69の
- 73. 前把第1および第2核酸分子の一方がPDGFAをコード化し、前記第1および第2核酸分子の他方がPDGF Bをコード化する糖求項69のキット。
- 74. 請求項65の分離された核酸分子に感染した細胞系。
- 75. 荫求項66の分離された核酸分子に感染した細胞系。
- 76. 細胞に対するPDGF効果を増進する方法であって、PDGFの影響を増進するに十分な量の、請求項59のPDGFアゴニストを投与することからなるもの。
- 77. 細胞に対する P D G F 効果を増進する方法であっ
- て、PDGFの影響を増進するに十分な量の、請求項60のPDGFアゴニスト

を投与することからなるもの。

- 78. いずれかの単量体上のアミノ酸123か、いずれかの単量体上のアミノ酸132の少なくとも一方がシステインでない、分離されたPDGF AA二量体
- 79. 一方の単量体上のアミノ酸123と他方の単量体上のアミノ酸132がシ
- ステインでない館求項 1 8 の分離された P D G F A A 二重体。
- 80. いずれかの単量体上のアミノ酸124か、いずれかの単量体上のアミノ酸133の少なくとも一方がシステインでない、分離されたPDGF BB二量体
- 81. 一方の単重体上のアミノ酸124と他方の単重体上のアミノ酸133がシステインでない縮求項80の分離されたPDGF BB二重体。
- 82. (1) PDGF Aの単重体またはPDGF Bの単重体 と (11) 非PDGF単重体からなり、前記2つの単重体が1個のジスルフィド結合によってつながれた、分離された二重体。
- 83.前記非PDGF単量体が増殖因子である請求項82の分離された二量体。
  - 84. 前記非PDGF単量体がVEGFである鞘求項82

の分離された二量体。

9

6

# [発明の詳細な説明]

血小板由来の増殖因子アンタゴニスト

## 関連出願

この出願は、1992年5月15日付出願のアメリカ特許出願連続番号第88 3,949号の一部継続である。

# 発明の分野

この発明は、血小板由来の成長因子つまり「PDGF」として知られる分子のアンタゴニストに関する。より具体的には、PDGF—BBに対する、単量体と二量体の両方の、アミノ酸含有アンタゴニストに関する。アンタゴニストの鋼製に有用な種々の核酸塩基物質と、その使用も説明する。

# 背景および従来の技術

P D G F は当初、平確筋細胞と繊維芽細胞に対して成長促進作用を持つ血小板 な動粒の成分として認識された(ヘルディン・アンド・ウエスタマーケ、セル・ レギュル I:555-566 (7-90) (Heldin and Westermark, Cell Regull:555-56(7-90))。また、それは、結合組織由来の細 間の生体外での刺激で(イーストマン他、ジェイ・バイオル・ケム263(31): 16202~16208 (11-88) (11-88 (Oestman et al., J. Biol. Chem. 263(31)): 16202-16208(11-88))、 間充機細胞に対する主要なマイトジェンタンパク質として (マレー他 (Murray et al.)、アメリカ特許第4,889,919号および第4,844 5,075号)、そして培養された筋肉細胞、機維芽細胞および閉細胞における細胞・増殖とDNA合成の誘導物質として (ケリー他 (Melly et al.)、 国際出願W990/14425(11-29-90)) 示された。また、それは傷の治療反応に関与するとが示され (ロス他、エヌ・イング・ジェイ・メド295:369(1976))、 動脈硬化症の増殖性損傷の進行の原因となる役割に関与する可能性もある(上配ロス)。他の者は、この分子が纏瘍の発達と、非悪性で増殖性のある障害の仲介物である可能性を示唆した(上記・ルディン他)。

PDGF分子は非常によく特徴づけられている。それは、ジスルフィド結合を介して互いに結び付いた「A」鎖および「B」鎖のヘテロダイマーとして存在することが知られている。その二重体は、ときどき「PDGF-AB」と呼ばれるが、約30KDaの分子質量を持つ。AおよびB鎖のアミノ酸配列が知られており、例えはマレ一他(Wurray et al.)のアメリカ特群第4,889,919号

および第4,845,075号に示されているが、その開示を言及することで本書に取り入れる。成熟鏡は100個より少し多いアミノ酸を含み、約60%相同である上記へルディン(他)。

PDGF分子は非常によく特徴づけられている。それは、ジスルフィド結合を介して互いに結び付いた「A」鎖および「B」鎖のヘテロダイマーとして存在することが知られている。その二重体は、ときどき「PDGFーAB」と呼ばれるが、約30KDaの分子質量を持つ。AおよびB鎖のアミノ酸配列が知られており、例えばマレー他(Murray et al.)のアメリカ特群第4.889,919号および第4,845,075号に示されているが、その開示を含及することで本書に取り入れる。成款総は100個より少し多いアミノ酸を含み、約60%相同である(上配ヘルデン、ルル)

二量体PDGF—AAおよびPDGF—Bは組替え手段によって生成され、 自然確から分離されている(上記マレー他、上記ヘルディン他を参照)。種々の 二量体、つまり" イン型"は、機能性および分泌作用が異なる。 PDGFが細胞に作用するメカニズムが締密に弱べられ、PDGFに2個のレセプタ、「a」および「β」レセプタ、があることが証明された。aレセプタはすべて

のイン型を結合し、 βレセプタはPDGFーAAを結合せず、PDGFーABを 低銀和力で結合し、 PDGFーBBを高銀和力で結合する(上昭ヘルディン他、 上記イーストマン他)。 αレセプタは170KDaのものに成熟する140KD a前額タンパク質として合成され、 βレセプタは160KDaの前額体および1 80KDaの成熟分子として認識される。両レセプタのcDNAも分離されてい

(11)

る(上記ヘルディン他、上記ケリー他)

両レセプタは、5個の免疫グロブリン状のドメイン (細胞外的分) と、キナーゼドメインと相同性を持たない特異的挿入配別を持ったプロテインチロシンキナーゼドメインを含む細胞内タンパク質からなる (ヤーデン他、ネイチャー323:226~232 (1989): オレソンーウエルシュ他、PNAS86:4917~4921 (1989): クレソンーウエルシュ他、PNAS86:4917~4921 (1989): クレソンーウエルシュ他、PNAS86:4917~4921 (1989): PDCFがこれらのレセブタに結合すると、レセブタ分子の二重化が誘発され、引続きレセブタのキナーゼ活性化と自動加燐酸化が生じる (ヘルディン格、ジェイ・バイオル・ケム264:8905~8912

(1989);ガイファート他・ジェイ・バイオル・ケム264:8771~8778 (1989);ビシャイー他・ジェイ・バイオル・ケム264:11699~11705 (1989); Selfert et al., J. Biol. Chem. 264: 8771-8778 (1989); Bishayee et al., J. Biol. Chem. 264: 11699-11705 (1989)。

PDGFの多様な作用と病状への示唆された関与は、アゴニスト (作用物質) とアンタゴニスト (反作用物質) の使用かPDGFの作用を限定し、一部の障害 を和らげるのに有用である可能性を示している。これらの分子は、上配ケリー他 が採用した定義を使えば、PDGFの効力によく似る (アゴニスト) か、レセプ タとリガンドの相互作用を阻止する (アンタゴニスト) かのとちらかてある。

種々の物質に対してアゴニストとアンタゴニストが存在することが古くから認められ、ケリー他はその記載を通じて、事実上、PDGFに対してこれらが存在することを推定している。しかし、文献を調べてみても、PDGFに対するタンパク質性のアゴニストおよびアンタゴニストは教示されていない。上記の理由で、そのような物質を確保することが望ましい。

マレー他の上記2件の特許は、分子の生物学的活性を破壊しないことを条件に

、単量体の鏡のシステイン残基のアミノ酸雷換の可能性を記載している。'919号特許は、絵じてPDGF-AA分子の変成を教示している。いずれの引倒も、PDGFの変成二量体が野生型のPDGFに対するアンタゴニスト活性を持つこ

とを教示していない

PDGF単載体のアミノ酸機中の置換かPDGFーBBに対するアンタゴニストの生成をもたちすことが判明している。PDGFーBBは細胞の形質転換に関係するので、以下の開示で配載するように、アンタゴニストは治療の面と他の種々の環境において価値を持つ。

# 図面の簡単な説明

図1は、例で詳しく述べるペプチド16TのHPLC精製を示す。

図2は、αレセブタに結合する<sup>us</sup> 1-PDGF-AAに対するペプチドの競合倍性を示す。

図3A、3Bおよび3Cは、種々のリガンドのPDGFレセグタとの結合に対する種々のHPLC精製PDGF由来のペプチドの競合活性を示す。

図4は、125 I -標識されたPDGF-AAのインタ

ーナリゼーションと分解に対する種々のPDGF由来のペプチドの阻害効果を示すデータを提示する。

図5は、ペプチド16Tによるレセプタの二量化と自動加燐酸化の阻沓を示す

図6Aは、二番体PDGF-AAに対する選売的シチオトレイトール(「DTT」)の影響を示す。

図6Bは、二量体PDGFの還元後の単量体物質の熔離を示す。

図7Aは、タンパク質分解、部分還元された単重体PDGF-Aから得られた HPLC情報を示す。 図18は、図1AのHPLC実験から浴籠したペプチドのアミノ酸配列を記載している。

図84および8Bは、 [\*\* S] ーツステインで蘇臘した後の免疫化降されたならし始地の分析を示す。

3

図9は、細胞成長と、122 - P D G F - B B とペプチドの迸绕希釈との統合に関する実験を示す。

図10Aおよび10Bは、PDGF B誘導体を使用したSDS-PAGE免疫は降の研究(10A)と、二量化に対する誘導体の影響(10B)を示す。

図11Aは、PDGF-AA 二重体形成の研究を示す。

図11Bは、単結合二量体のレセプタ競合活性を示す。

図12は、従来技術と表示されているが、プラスミドpSV7dの制限地図で ある. 図13は、PDGF-Aの免疫は降と、COS細胞での発現後の突然変異PDGF-Oを大体示す。

図14は、突然変異PDGF-OとPDGF-Aを使用した結合側定の結果を

まず

図15は、PDGF-0のDNAとの感染後のPDGF-B生成雑酒の免疫な路に関するデータを示す。

図16は、pSV7d--PDGF-O感染sis3T3細胞によるPDGF-

OBヘテロダイマーの生成を示す。

図17 は、s1s3T3 FDGF-0生成物質と非生成物質の形態を比較している。

図18は、sis3T3の増殖に対するPDGF-0の影響についてのデータをグラフで示す。

図19は、sls3T3細胞のコロニー形成に対するPDGF-0の影響を示

ţ,

I

好適実施例の詳細な説明

レセブタ結合をテストするために、ヒト包皮機維芽細胞系A G 1 5 1 8 (ヒト 突然変異細胞委託機関から得た)の培養を、10%新生行ウシ血清を含むハムF

始で密集成長させた。PDCFーβレセプタ粘合の分析に使用される細胞は、1 mg/m1のウシ血滑アルブミン (BSA) と5 0 ng/m1のPDGFーA で補足されたハムFー12 塔地の 0. 5 m1/ウェルで3 7 ℃で6 0分間、前保持 (プレインキュペイト) した。この組合せは、クレソンーウエルジュ他、ジェイ・パイオル・ケム2 6 4 : 1742~1747 (1989) に示されているように、PDGFーαレセプタをダウンレギュレートする。

 氷冷却結合緩衝液(0.9mMのCaCl<sub>2</sub>、0.49mMのMgSO4および 1mg/mlのBSAを含んだ構験塩緩衝液)で細胞を洗って、レセブタ結合分 が用に調製した。そして、異なる濃度(0~100μg/ml)の合成ペブチド (下配の表1に配載)と、1ウエルにつき0.5mlの結合緩衝液で、細胞を氷 上で90分間、保持(インキュベイト)した。その後、<sup>13</sup> 1標離PDGF-A A、PDGF-BBまたはEGFを加えた。標識されたリガンドを加え、0℃で60分間保持してかち、氷冷却結合緩衝液で細胞を5回洗った。洗われた細胞を、冷解緩衝液(1%トリトンX-100,10%グリセロール、20mMトリス 14Cl、pH7.5)中で塔温で60 分間溶解させた。ガンマカウンタで可溶化放射能を測定した。非缥雕リガンドを 使用して、合成ペプチドの競合活性を標準曲線と比較した。 使用したペプチドはすべて、PDGF-Bのアミノ酸配列由来のものであった。アミノ酸名称は、ペッツオルツ他、ネイチャー3 20:695~699(1998) に配載されたものにもとづくもので、その開示を言及することで本着に取り入れる。この輸文は、PDGFのA鎖および B鎖の両方の完全な非プロセス配列を示している。本書で数字を使用するとき(例えば「Cys 123」)はその単量体の完全な非プロセス公子を増度するに、システィン基の位置つけに順番を使用するときはプロセス分子を指すことを理解されたい。プロセスPDGFのA鎖の最初のアミノ酸はセリンで、非プロセス分子の位置87に存在する。PDGF-B鎖の最初のアミノ酸さセリンで、非プロセス分子の位置87に存在する。PDGF-B鎖の最初のアミノ酸さセリンで、非プロセス分子の位置87に存

(16)

2に存在する。非プロセスPDGF-Aは211個のアミノ酸の長さで、非プロセスPDGF-Bは241個のアミノ酸の長さである。

### 表

合成ペプチド

PDGF-Bアミノ酸配列の部分	155-180,但 U 178 の Cys は Ser に 変化	141-163	142-163	142-179	111-140,但し124、133及び134のCysは Serに変化	116-127	116-127及び 147-163	121-127及び147-163	116-127及び 147-157	116~127 及び 147~163	116-124及び152-163	116-123 及び152-163	116-123 及び153-161	116-121 及 仅 153-161	116-119 及び 154-162	116~121 及 以 157~163	107-127 B U 152-163	98-106 及び116-127及び 152-163	112-121及び 157-163	116-121 及 以 157-163	116-121 及び 157-163 但しトリナトファンがチオアニットルに変化	116-121 及び 157-163,但しトリバッンがことのフェールスルフォニル によって 歌 成		Glu Ala Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Asn Lys Val Pro, 但しトリナトップが チオフニッールによって変成
ペプチド番号	-4	2	e	4	ις.	9	7	<b>ss</b> )	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	161#	*16	#16T	*16NPS	<b>*</b> 20	*20T

表しで、\*印は均一のペプチドの使用を意味する。それ以外は粗ペプチドが使用

された。均一ペプチドと粗ペプチドの説明は以下で行う。

PDGF-Bの結合を阻害するペプチドの能力を、結合を50%低下させるためにどれだけのペプチドが必要か、ということで側定した。表2で、「+++

」は<30μM、「++」は30~60μM、「+」は60~150μM、そして「-」は>150μMを意味する。

## 聚 2

結合に関してPDGドーBBと競合する能力

阳略活性	1	•	1	‡	+	+	·‡	ı	Ī	<b>‡</b>	‡	+	+	+	í	‡	‡	‡	‡	•	‡	ŧ	1	1
ペプチド	m	2	n	4	ນດ	vo	7	80	O.	10	11	12	13	14	15	16	17	18	*19T	+16	*16T	*16NPS	+20	*20T

PDGF-BBに対する阻害の結果のみを示すが、 PDGF-AAを使用しても同様な結果が得られた。

テストしたペプチドはすべて、PDGFーBのアミノ酵97~180 (「Cys-Cys-1) の部分に由来するもので、それはこの部分が分子の全生物学的活性を及ぼすに十分であると判明しているかちである。 (キング他、プロク・ナトル・アカド・サイ・USA82:5295~5299 (1985) (King et al

(18)

., Proc. Natl. Acad.Sci. USA 82: 5295-5299(1985))

共直鎖状ペプチド1~6は、限られた阻害性のみを生じた。ペプチド4および 5で得られる弱い阻害性は、配列のこれら2つの部分の組合せがより効果的かも 知れないことを示唆した。 29個のアミノ酸の長さで、12のN末端部分と17のC末端アミノ酸を含む ペプチド7は、両レセプタに効率的に競合し、約6μΜで50%の競合であった テストした。ペプチド7の5個の最N末端アミノ酸が欠失したペプチド8はほと 。この結果にかんがみ、関連エピトープを狭めるために追加のペプチドを認製し エピトープ接合のN末端側の3個のアミノ酸を除去したり (ペプチド10)、5 個のC末端アミノ酸を除去すると(ペプチド11)、活性に対する影響が低下し んど無活性で、6個の最C未端アミノ酸が欠失したペプチド9も同様であった。

2つのエピトープをさらに定義する賦みは、ペプチド16の生成をもたらし、 そのアミノ酸配列は

# ANFLVWEIVRKKP

ョン(拡張、ペプチド17~19)は活性を高めなかった。これらの実験から得 ドが、aおよびβレセプタに対するPDGF-AAおよびPDGF-BBの結合 で、レセプタ競合活性をほとんど維持していた。しかし、2個の接合アミノ酸を られた結論は、13個のアミノ数長さで、P D G F の B 鎖の 2 部分を含むペプチ 取り去ると、分析できない不溶性ペプチドを生じた。NH2未端のエクステンシ の効果的な競合物質だということである。

例1の実験で使用したペプチドは、ペプチドシンセサイザーを使用したt-B o c 化学で<equation-block>製した。それらは、8 %アニソールと 4 % メチル硫化コチルをスカ ベンジャーとして、0℃で60分間HFでの保持によって高分子支持体から切断 した。トリプトファンを含むペプチドには3%チオアニソールを加えた。これら の問製物は粗製のものである。

ペプチド16で得られた興味深い結果は、精製物を使用した実験を提起した。

その目的で、0.1%トリフル

オロ酢酸中の10~90%アセトニトリルの30分勾配を使用したNydacC 18カラム (10×250mm) による逆相HPLCでペプチド16を精製した , サンドクビスト街、マス・スペクトロメトリ・レブ4:421~460 (19 8 5) (Sundqvist et al., Mass Spectromelry Rev. 4: 421-460(1985)) 忆花 って、22 Cfプラズマ脱着質量分析を使用して、ペプチドを特定し、分析した 。そして、上配方法と質量分析で、HPLCからの各画分を分析した。 意外なことに、ペプチド16の予期された分子質量を持った成分(表1および 2の「16\*」)は、他のHPLC成分と比べて非常に低い活性を示した。ペプ チド16より大きい122Daの分子質量の成分はより高い活性を示した。HP HPLC精製が図1に、そして種々のHPLC画分の競合活性が図2に示されて LC研究の分析により、チオアニソールが質量分析中にペプチド16のトリプト ファンに結合しているという結論に至った。「16T」と呼ぶこのペプチドをよ り大量の得るため、より濃度の高いチオアニソールを保護解除段階で使用した。 いる。次の表3はHPLCで決定したイオンの構造と質量の案を示す。 (50

隻3 ペプチド16のHPLC精製(図2B)の間に収

集された画分の質量分析

画分	<b>観察m/2</b>	分子案(括弧内はm/z子型値)
1	1452.6	M-Phc (1453.7)
	1581.6	M Nimi (1582.9)
7	1601.0	M (1600.9)
	1581.5	M Nimi (1582.9)
8	1599.2	M (1600.9)
4	1485.8	M-Asn (1486.8)
	1599.2	M (1600.9)
	1644.9	
ر,	1644.8	
	1560.0	
9	1574.0	M122-Phe (1575.9)
	1654.9	M+tBu (1657.0)
7	1708.1	M122 Nimil (1705.8)
∞	1721.2	M122 (1723.1)
σ	1754.0	M + Tos (1755.1)
	1722.8	M122 (1723.1)
	6.6891	M + OB <sub>21</sub> (1691.0)
	1651.1	M122 - Ala (1652.0)
	1594.2	M122 - Lys/Glu
		(1594.1/1593.9)
10	1724.7	M122 (1723.1)
	1608.5	M122 - Asn (1609.0)
11	1763.9	M122 Nimi + tBu (1761.2)
12	1778.1	M122 + tBu (1779.2)
13	1778.1	M122 + tBu (1779.2)
14	1846.9	M122 + Clz (1847.6)
	1875.8	M122 + Tos (1877.3)
15	1847.0	M122 + Clz (1847.6)

路抄: M、ペプチド16; M122、ペプチド16T;N1tr11、脱水

アスパラギン: Bu、第三プチル; Tos、4ートルエンデスルホニル; O

Bz1、ベンジルエステル; С1-2、2-クロロベンジルオキシカルボニル

<u>ال</u>ا

トリプトファンの変成が活性を可能にするという仮定をテストするために、ト

リプトファンと反応することが知られている2-ニトロフェニルースルフェニル クロライド (NPSーC1) で保持した (スコフォン他、バイオケム7:971 ~979 (1968) (Scoffone et al., Blochem. 7:971-979(1988)を参照) )。その結果得られた誘導体「16NPS」も、ペプチド16と比較して、アンタゴニストとしてより高い活性を持っていた。 図3A、3Bおよび3Cに示す比較実験で、"s IーPDCFーAAと"s ーPDGFーB (aおよびβレセプタ)の両者に対するペプチド16および16Tの鍵合活性をテストした。図は、PDGFーAAとPDGFーBBの両方に対して、ペプチド16はわずかな効果しかないが、16Tが有効な競合物質であったことを示している。"s IーPDGFーAAと"s IーPDGFーBB

に結合するレセプタに対し、それぞれ44μg/ml(26μM)と57μg/ml(10mm)のペプチド16Tが50%の鉄台を与えた。

任道のアミノ酸配別を持ったペプチド、つまりペプチド20 ねよび20 Tで、後者はトリプトファンにチオアニソールの変成を担持したもの、を使用して対照を行った。図2 A、2 Bおよび2 Cに示すように、ペプチドは結合に競合しなかった。これちの実験から得るべき結論は、アミノ酸配列とトリプトファン変成が統合作用に重要であるということである。

図3Cは、ペプチド16、16T、20および20Tのいすれもが、EGFレセプタに対する<sup>123</sup> 1-EGFの結合に競合しないことをしめす。従って、ペプチド16TはPDGFレセプタ競合に対して特異的である。

4日4

ヒトの繊維芽細胞による「3H]チミジンの組込みを調べた。表1Vは、PDG

(22)

F-B B と E G F が機維芽細胞への [<sup>3</sup> H] チミジンの組込みを、それぞれ4倍と5 倍に刺激したことを示す。 P D G F - B B による刺激の方が弱かったが、これはエスラー他、セル52:791~799 (1988) (Misler et al., Cell 52:791-799(1988)) によって得られた結果と一致した。ペプチド16 およびが16 T I F T I P D G F - A A およびP D G F - B B 誘導の分裂促進を確かに阻害したが、E G F 誘導の分裂促進を阻害した。このことは、ペプチド16 および16 T がレセプタに対する競合のレベルのみで作用したのではなく、別のメカニズムも関与していることを示す。ペプチド20、つまり対照はリガンドの刺激による [ 3 H] チミジンの組込みにわずかな影響を示し、一方、ペプチド16より効率的で、[ P H ] チミジンのバックグラウンド組込みを大幅に低下させた。

投4 リガンドの刺激による[3H]チミジンのヒト包皮維維等細胞への組込みに対するペプチド16、16T、20および20Tの彩磬。数字は複製の平均を表す。

-		慰飯 用の リカント	2 / 2 6	
みずれド	垂	PDGF-AA	PDGF-BB	EGF
	(cbm)	(cbm)	(cpm)	(cpm)
制御	483	<i>L</i> 19	1918	2591
ペプチド16	241	242	281	216
ペプチド20	348	535	121	2059
ペプチド16T	\$	8	102	119
ペプチド20T	456	489	836	515

#### 例5

無傷の細胞に対するペプチドの影響を弱くるためにさらた実験を行って、特に リガンド分解の阻害を闘くた。

そのために、12ウエル回の密集したとトの包皮繊維芽組制を、1mg/mlのBSAで補足された1.0mlのNJF-12培地で一度洗った。上記のよう

に、後で12 1-PDGF-BB分解のテストに使用する細胞は、

αレセブタをダウンレギュレートするためにPDGFーAAで削保持した。そして、1mg/mlのBSAを含む0.5ml/ウエルのハムFー1 2 始地で、それぞれ異なる濃度のペプチド16、16T、20および20Tと<sup>123</sup> 1標識PDGFーAA、PDGFーBまたはBGFとともに細胞を保持した。その混合物を37℃で4時間保持し、保持始地を取除き、10%の最終濃度のトリクロロ酢酸の不は降放射能量をリガンド分解の評価値とした。つまり、それは取り込まれ、分解され、自由な<sup>123</sup> 1、17 1、または低分子量断片として培地内へ放出されたリガンドを表す。このパラメータは37℃で4時間保持した後決定した。

図4は、すべてのペプチドがns I - P D G F - A A分解に対してある程度の 阻害倍性を示し、ペプチド 1 6 T が最も有効であることを示す。 P D G F - B B 分解についての効果はより低く、ペプチド 1 6 T が最も強力であった。すべてのペプチドがns I - E G F 分解を阻害したが、すべてのペプチドも同様な活性を示した。 これらの結果は、ペプチド16Tが細胞に影響し、それがPDGFレセプタレペルでの特異的阻音と、PDGF特異的でない細胞内での結果の組合せであることを示し

ている。

9110

上配結果は、ペプチド16 Tがaおよびβレセブタの両者と相互作用することを示している。レセブタに対するPDG Fの結合がレセブタの取込みとダウンレギュレーションを生じるので、PDG Fとペプチド16 Tの相互作用がレセブタの取込みとダウンレギュレーションを起こしたのか調べた。これをテストするため、上記の密集細胞を37℃の結合緩衝液で一度洗ってから、異なる濃度の合成ペプチド(1mg/m1のBSAを含む0.5m1のPBS)と保持した。その後、細胞を37℃でも時間保持してから、20mMの酢酸ナトリウム、150m後、細胞を37℃でも時間保持してから、20mMの酢酸ナトリウム、150m

Mの塩化ナトリウム、0.2%BSAからなり、酢酸でpH3.7に鞴墜した1mlの氷冷却緩衝液で洗い、そして、細胞を緩衝液中の氷上で1の分間保持し、1m1のpH7.4の結合緩衝液で二度洗った。細胞表面のPDGFレセプタの数を、0.5m1の結合緩衝液での<sup>12</sup>1-PDGF-BB(-50,000cpm)と氷上で60分間の保持、洗浄、溶解および細胞結合放射能の概定によっます。

結果は否定的であった。つまり、ペプチド16丁は

PDGF-aおよびBレセプタをタウンレギュレートしなかった。

#### 四7

ペプチド16TのPDGFレセプタとの相互作用がアゴニスト的がアンタゴニスト的かを聞べる研究を行った。これは無傷の細胞におけるPDGFおよびEGFレセプタの二重化と自動加媒能行の研究を含んだ。

密集したとトの包皮繊維芽細胞を使用した (25 cm<sup>2</sup>皿の培養)。上記のように 1 mg / m 1 の B S A を加えた結合緩衝液で細胞を二度洗った。その後、氷上で合成ペプチド 1 6、16 T、2 O および2 O T のひとつと9 O 分間保持した。そして、P D G F ー B または E G F (30 0 n g / m 1)を加えてから、さらに6 O 分間保持した。そして、基本的にエリクソン他、グロウスファクターズ6:1~14 (1992) (Eriksson et al., Growth Factors 6:1-14(1992) )に従って、二重化の定量を行った。基本的には、溶解緩衝液(0.5% F リ F ソメー100、0.5% デオキシコレート、2 0 μ M の p H T. 4 のへペス、15 0 m M の塩化ナトリウム、10 m M の E D T A、1 m M の P M S F (フェニルメチルスルホニルフロリド)、1% トラシロール、アプロチ

ニン)、100μMのオルトバンダト (ortowandat)、ホスファターゼ阻毒剤) 中の1mMのB S<sup>2</sup> (ピス (スルホスクシニミジル)スペレート)で、裕塩で2 0分間レセブタを架橋させた。70mMの塩化メチルアンモニウムを10分間加 えて、架橋をクエンチングした。そして、サンブルを4%スラブゲル中のSDS ヴル電気泳動に付してから、ニトロセルロース臓へエレクトロブロッティングし

た。遮断された脚を、親和精製されたホスホチロシン抗体(エク也、ジェイ・バイオル・ケム259:1145~11152(1984)(以 et al., J. Biol. Ghen. 259:1145-11152(1984))で2時間保持してから3回洗った。そして、プロットを、ペルオキンダーゼ複合、親和精製されたブタのアンチラビット18(5晩グロブリンで、45分間保持した。さらに3回洗ってから、複合体をECL現像システムで可視化した。

図5に示す結果は、PDGFとEGFが両方ともレセブタの自動加燐酸化を誘発したことを示している。架橋後、大半の自動加燐酸化レセブタが、恐らく二量体を表すぼやけた2倍サイズ部分(図5の角かっこ)として視覚化された。

ペプチド16 Tを使用した場合、PDGF誘発の自動加燐酸化と二量化は約55%阻害された。EGF誘発の

活性には影響がなかった。対照ペプチド20Tはなんちの影響も示さなかった。 これちの結果は、ペプチド16Tかアゴニストではなく、アンタゴリストである ことを示している。

#### <u>刻</u>8

自動加燐酸化と二量化に関連する実験をさらに行った。これらは部分的に精製されたDOFトーβレセプタを使用したので、より定量的である。

トリトンX-100で可洛化したブタの子宮髄を、レンストランド他、ジェイ・バイオル・ケム262:2929~2932 (1987) (Roennstrand et a 1., J. Biol. Chem. 262: 2929-2932(1987)) のモノQクロマトグラフィのステップまで精製したものかち、PDGF-βレセブタを瞬製し、そこに配載された自動加燐酸化の定量を行った。

約100ngのレセプタを、異なる濃度のペプチド16Tまたはペプチド20と、0℃で5分間保持した。PDGF—BB(100ng)を加えて、さらに15分間保持した。保持混合物は全体量が $40\mu$ 1で、最終濃度として、0.1%トリトンX-100、5%Fリセロール、F0、5F10の 5F10の 5F10の 5F10の 5F10の 5F10の 5F10の 5F10の 5F10の 5F10の 5F1000 5F10

(22)

ペプチドの存在しない状況で、図5に示すように、PDGFはその180KDaのレセプタと130KDa分解生成物の自動加燐酸化を誘発した。共有架橋後、大半の自動加燐酸化物は約350KDaで二重パンドとして見られた。

ペプチド16 Tが存在すると、濃度が増加するにつれて、二重化と自動加燐酸化の両方が減少した。5 μgのペプチドで、ほぼ完全な阻害が得られた。対照ペプチド20は20μgまでの濃度で影響を示さなかった。ペプチド16は中間的な影響を持ち、20μgで完全に阻害

した。これらの結果は、上記リガンド結合の阻害の研究で得られたものと対応す

#### 6個

組替え P D G F ー A A 長スプライス変異の邮分標本を、異なる濃度のジチオトレイトール (「D T T 」)と、特温で2時間保持した。そして、これらのサンプ

ルを、非還元条件を使用して、SDSゲル電気法動でアルキル化し、分析した。 その後で銀染色を行った。 図6Aは、DDTの濃度の増加につれて、PDGF-AAが30KDaから17KDaへ徐々にシフトしたこ

と、二量体から単層体へシフト、を示している。3mMのDTTで、ほとんどすべてのPDGFが単量体として現れたが、その物質は完全に還元されたPDGFよりゆっくり移動し、鎖内結合が残っていることを示唆した。

この実験は、鎖間結合が鎖内結合より還元されやすいことを確認し、この方法 の使用により、関係する特定の残差を特定できることを示唆している。

#### 2

例9の実験は準備的スケールで行われた。90μgの組替え長スプライスPD GFーAAが220μ1の0.36MトリスHC1、pH8.2中で、3mMの DTTで、20℃で2時間処理された。これにより傾間SH結合が露出し、それ を同じ溶液中で15分間9mMの3一ド酢酸と反応させて基をアルキル化した。 アルキル化した単量体を、15ml/hの流量の、6Mの尿素、0.3Mの塩化 ナトリウムおよび1Mの酢酸中で、スペローズ12(1×30cm)のゲルクロ マトグラフィで分離した。図6Bに示すように、2つのピーケが溶出した。プロ ーベル他、ジェイ・セル・バイオル67:835~851(1975)(1975)(Blobe 1et al., J. Cell Biol. 67:835-851(1975))に従って、SDSゲル電気泳動 を分析し、その後銀染色を行った。そのゲル研究は、2つのHPLC断片が単量体と二量体であることを示した。単量体物質を、細孔ブラウンリー・アクアボアこ1カラム (narrow bore Brownlee Aquapore Cl column) を使用した逆相HPLCで脱塩することによって分離した。その物質を二分した。一方をレセブタ結合定量に使用し、他方を完全に還元した。その物質を二分した。一方をレセブタ結合定量に使用し、他方を完全に還元した。その物質を二分した。一方をレセブタ結のでで数約するが、完全還元に関する方を最初に述べる。レセブタ結合は、下配の例14のプロトコールを使用して行った。

(28)

## 医

部分還元された単量体P D G F − A を、4 MのグアニジンH C I、1 MのトリスH C I、p H 8.0、および10mMのE D T A 中の20mMのD T T で、27で2時間かけて完全に還元した。これで単量体が完全に還元され、それを4一ピニルビリジンで処理した (特価で2時間の保持)。還元された単量体を上記のように脱塩し、乾燥させた。4 − ピニルビリジンでの処理はシスティン残基をピリジルエチル代し、254 nmで可視化した。

還元物質を、200μ1の2M尿素と0.1M重炭酸

アンモニウム中で、3 7℃で15時間、1/50 (w/w)の酵素/基質比のC 1u-Cプロテアーゼで加水分解した。反応時間の終了時に、その混合物をブラウンリー・アクアボアC4 (2. 1x30mm) 細孔カラムに入れ、100μ1/分の流量のn-プロパノール(0~27%、超60分)0.16%トリフルオロ酢酸の直線勾配で断片を溶出させた。フォトダイオードアレー検出器で溶出物を監視し、200~300nm間でスペクトルデータを収集した。

これらのHPLC断片を、ポリプレン処理したガラスファイバディスク上で乾燥させ、周知のエドマン分解を行った。HPLC値報を図1Aに示す。システイン残基を含んでいた配列を図7B(つまり、配列SP1、2、3および4)と、配列認識番号(SEQ ID NOS)に示す:

図7Bで、「#」はカルボキンメチルシステインで、「@」はピリジルエチルシステインでもる。

機間ジスルフィド結合に関係するこれらのシステイン残基は、ヨード酢酸の作用で、カルボキシメチルシステインとして現れるはずで、一方、鏡内結合形成システインはピリジルエチルシステインとして現れるはずである。これらの結果は、PDGF-A単量体の第2およじ第4

システイン残基が微間ジスルフィド結合を形成することを示している。

## 711.2

例11の結果をさらに調べるために、Cys123とCys132がセリンに

なるよう、PDCF分子のCDNA配列コーディングを変異させた。これを行う ために、PDGF-Aの短スプライス形のCDNAを使用した(ペッショルツ他 、ネイチャー3 2 0:695~699 (1986) (Betsholtz et al., Matur e 320:695-699(1986))。クンケル他、メス・エンジモル154:367~38 2 (1987) (Kunkel et al., Meth. Enzymol 154:367-382(1987)) に従っ て、残基の一方または両方に対応するコドンを作り、pSV Ser 2、pSV Ser 4、およびpSV monoAを得た。ウラシルを含むテンプレートを コード化する野生型PDGFーAも生成した。同様に、B鎖CDNAの対応する コドン(PDGF Bストップ変異のCys124、Cys133)を変異させ てpSV monoBを生じるとともに、コドン191を停止コドンに変換し、 可溶生成物を得た(イストマン他、セル・レグ2:503~512) (Gestman et al., Cell Reg. 2:503-512)。 ペクターpSV monoA、pSVA Ser2、およびpSV Ser4をつくるために、イストマン他 ジェイ・バイオ・ケム263:16202~1620<br/>
をつくるために、イストマン他 ジェイ・バイオ・ケム263:16202~16208(1988)<br/>
いた教示されたように、変異断片をベクターpSVーPDGFーA 102A<br/>
(pSVA)のEcoRI/Bal 1師位にクローン化し、野生型断片を切除した。ブラスミドpSV7dのEcoRI節位にクローン化することによって、構造pSV monoBを生成した。このブラスミドは周知で、その構造はトルエット他、DNA4(8):333~349(1985))の図2に示されている。それは図12としても示されて

#### 例13

7.30

p V S A およびp S V B ストップを含む例 1 2 の構造を、イストマン他、セル・レグ2:503~512 (1991) (Oestman et al., Cell Reg. 2: 503-512(1991)) に従って、60mm焙養皿の2 0 μ g のプラスミド D N A と 0. 5~1 x 1 0 6 の細胞を使用して、C O S 細胞を原染させた。原染後2 日目に代謝標額を行った。0.1 m C 1 [\*\* 5] システイン/m 1、1 0 %

(23)

ラリーを加えた。これを4℃で30分間保持し、遠心分離でピーズを取り除いた した。そして、ビーズを、O. 5Mの塩化ナトリウム、20mMのトリス、pH 笹地を収集し、遠心分離で細胞かすを取り除いた。細胞をPBSで一度洗い、か き集めて、0.5m1の0.5M塩化ナトリウム、20mMトリスHC1、pH 7. 5、0. 5%トリトンX-100%、1%アプロチニンおよび1mMのPM SFで溶解した。細胞溶解物を10,000gて15分間遠心分離にかけ、上澄 15μ1の正常なウサギ血滑で4℃で1時間保持することによって、サンプルを 予備滑燈化した後、60μ1のPBS中の50%タンパク質Aセファローズのス 7. 5、5mg/m1のBSA、1%トリトンX-100および0. 1%SDS で5回、20mMのトリスHC1、pH7.5で1回洗った。200μ1の非選 の透析したウン胎児血清、および抗生物質で補足した1. 5m1の無システイン 4℃で2時間保持した。さらに、再びタンパク質Aセファローズ(上配)で保持 MCDB104培地で一晩細胞を増殖させることで、これを達成した。標識後、 みに対して、PDGF-AAの抗血清を使用した免疫沈降を行った。基本的に、 ,その後で、15μ1の抗PDGFAAまたは抗PDGF—BBを加えてから、 元サンプル緩衝液を加え、95℃ で3分間の保持によって、免疫複合体を溶離した。DTT (最終譲度10mM)を加え、95℃で2分間の保持によって、溶離物の半分を還元した。50mMの最終選度のヨードアセトアミドでアルキル化を行った。12~18%ポリアクリルアミドゲルとフルオログラフィを使用したDSゲル電気統劃で、サンプルを分

結果を図8 Aおよび8 Bに示す。図8 Aは、「S S J システイン標離された細胞からのならし培地が免疫は降されたとき、単量体の形のみが見いだされたことを示す。還元条件下で分析すると、P D G F mono Aがゲル中でシフトしたが、これは鎖肉ジスルフィド結合がゲル中でシフトしたことを示し、鎖肉ジスルフィド結合が存在することを示す。また、抗野生型 P D G F ー A 析血清はmonoーA を超離し、P D G F mono A の配座が二量体の 2 つの鎖と同様であるという理論を裏付けている。

平行変異体であるPDGF mono Bは、図8Bから理解されるように、同じ分析のパターンを示した。

#### 例14

以下の実数は、例13に従って生成した윒替えタンパク質を使用したしセグタ結合定量に関するものである。

ルオロ酢酸で洗い、保持物質を0.1%トリフルオロ酢酸のアセトニトリルで溶 る能力を分析することによって行った。細胞をファルコン24ウエルプレート( BSA、0. 9mMのCaClz、0. 5mMのMgClzを含むPBS)で1回 のための公知の量のPDGF-AAおよびPDGF-BB中で、0℃で2時間保 培地に変え、48時間培養を続けた。そして、培地を細孔逆相C4HPLCカラ aおよびβに対する結合を闘べた。この研究は、連続希釈と、AG-1518細 洗った。図9に示す異なる希釈液を含んだ200μ1の結合緩衝液、つまり標定 持した。結合緩衝液で細胞を2回洗ってから、200μ1の結合緩衝液中の放射 組替えタンパク質の場合、感染から36時間後に、培地を1.5m1の無血清 ム(2.1×30mm)へ加えて脱塩と濃縮を行った。カラムを0.1%トリフ 30,000cpm)を加えた。これを0℃で1時間保持してから、細胞を結合 離させた。蒸発後、サンプルをPBSの当初量の1/10で溶解し、PDGF— 線標鸛PDGF−AAまたはPDGF−BB (0. 5∼2ng;15, 000∼ 胞との結合に関して™ I−PDGF−AAおよび™ −PDGF−BBと競合す Falcon 24-well plates) で密集増殖させてから、結合緩衝液(1 mg/mlの 緩衝液で5回洗い、20μ1の

20mMトリスHC1、pH7. 5、1%トリトンX-100および10%グリセロール中で着温で20分間溶解させた。ガンマカウンタで可溶化12 1放射能を測定した。

βレセブタ定量を行う場合、上記の前喪失(prior depletion)も使用した。 結果は、図9に示すように、monoBが比較的よく競合したことを示す。検 出できる程度にαレセプタに結合しなかったPDGFmoBのデータは示し

33

ていない。

## 例15

PDGFレセプタに対する単重体PDGFの結合がブゴニスト的またはアンタゴニスト的な結果を生じたかを判断することが重要であった。従って、自動加燐酸化定量で Bレセプタを活性化するPDGFーmonoB分子の能力をテストした。 PSVB停止、 PSVmonoBに感染したCOS細胞の培養から、または模擬感染した細胞からのならし培地を、上記のように脱塩、濃縮した。レセプタ結合活性を調べるために、標準技法をしようして放射レセプタ定量を行った。その後、 PSVmonoB存止で感染させた細胞からの培の後、 pSVmonoB存止で感染させた細胞からの培の後、 pSVmonoB存止で感染させた細胞からの培

機度の1m1のならし培地で、4℃で30分間細胞を刺激した。100ng/m 1mg/m1のBSAと0, 1m1の[35 S] メチオニン/m1で補足された無 血清およびメチオニンMCDB104培地で、37℃で3時間標識した。異なる 1の組替えPDGF−BBを持つ1m1の模擬感染培地を使用して正の制御を設 定した。細胞をPBSで1回洗い、20mMトリスHC1、pH7.5、150 mM塩化ナトリウム、10mMのEDTA, 0.5%デオキシコレート、0.5 %トリトンX-100、30mMのピロ鰲駿、1%アプロチニンおよび1mMの PMSFの溶解緩衝液にかき入れてから、クリアランスのために10,000g で15分間遠心分離を行った。この溶解物の半分を、PDGF-Bレセプタ由来 養を模擬感染細胞で、100ng/m1のレセプタ結合活性に調整した。25c ひペプチドに対する 5 μ1の抗血溶(クレンソーウェルシュ色、ジェイ・パイオ m²の皿で増殖させたPAE細胞発現PDGF Bレセプタ (ウエスタマーク他 ル・ケム264:1742~1747 (1989) (Claesson-Welsh et al., Westermark et al., Proc Natl. Acad. Scl. USA 87: 128-132(1990)) 老、O. 、プロク・ナトル・アカド・サイ・USA87:128~132 (1990) J. Biol. Chem. 264: 1742-1747(1989))

他の半分をホスポチロシンに対する!μlの抗血溝(エク他、ジュイ・バイオル・ケム259:1145~11152(1984)(Ek et al., J. Biol. Chen

259:1145-11152(1984))で、40でで2時間保持した。免疫複合体を60μ1
 のPBS中の50%タンパク質Aセファローズのスラリーで沈降させ、どーズを、、路解緩衝液で3回、20mMのトリスHC1、pH7.5、0.5Mの塩化ナトリウム、1%緩衝液で2回、20mMのトリスHC1、pH7.5、0.5Mの塩化ナトリウム、1%トリトンX-100で2回、そして蒸留水で1回洗った。4%SDS、0.2mMのトリスHC1、pH8.8、0.5Mのシューケロース、5mMのEDTA、0.01%プロモフェノールブルーおよび2%メルカプトエタノールを含む100μ1のサンブル緩衝液を加えて免疫複合体を搭轄した。7%アクリルアミドゲルとフルオログラフィを使用して、SDSゲル電気洗動で免疫複合体を分析した。

図10Aおよび10Bはこれらの結果を示す。図10Aで、SDSゲル電気後動を使用した免疫沈降物の分析が、pSVB停止とpSVmonoBの両方が自動加燐酸化を刺激したことを示している。PDGF-monoBがレセブタの二重化をもたらしたか否かを判定するために、

βレゼブタ発現PAE細胞を [\*\* 5] メチオニンで標識し、関連構造のいずれかに感染させたこの3細胞からの濃縮ならし培地で刺激した。これらの実験で、pSVB停止、pSVMのnのBに感染させたこの3細胞または模擬感染細胞からの濃縮ならし培地1m1のボーションで、4で90分間、標離されたPAE細胞を保持した。細胞をPB5で1回洗い、20μMのpH7.4のペス、100mMの塩化ナトリウム、0.5%ノニデト (Monidec) P40、10%グリセロール、1mMのPMSFおよび1%アプロチニンを含む可溶化緩衝液中で、4℃で20分間溶解させた後、遠心分離溶液化(10,000g、30分間)を行った。1mMのBS<sup>1</sup>で、精温で30分間深稀を行った。50mMのトリスHC1、pH7.5中で、精温で10分間の保持で反応を止めた。免疫は降と分析は上記の通りである。図10Bに示すように、PDCFm0noBとPDGFーBの両方が二量化を引き起こした。

#### 제 1 6

第2および第4システイン間の鎖間ジスルフィド結合の配置を判定するために

(33)

8

実験を行った。そのために、2つの新しい変異体、つまり第2残基をセリン残基に変異

させたPDGF A Ser2と、第4残基をセリン残基に変異させたPDGFA Ser2、pSVA Ser4、を構成した。COS細胞をpSVA(A)、pSVA Ser4両方に感染させた。対応システイン残基間に鎖間結合が生じると(例えば第2システインがち第2システインが、または第4システインから第4システイン)、pSVA Ser2またはpSVA Ser4のみに感染させた細胞は二種体を形成しない。実際、二重化は共感染細胞だけに発生するはずである。

細胞を「25」システインで標識し、ならし始地または模擬感染COS細胞がちの培地を、抗PDGF AA抗血清を使用して免疫抗降し、DTTを使用して、あるいは使用せずに、SDSが小電気泳動で免疫抗降物を分析した後、フルオログラフィを行った。

図11Aは、共感染御胞にDTTが無い場合のみ二量体が検出され、架橋が生じたことを示す。このことから、第2および第4のシステイン残基がPDGF二重体で縦横にジスルフィド結合したと結論できる。

### / I S

上記感染細胞の活性を調べるためにテストを行った。

pSVA、pSVA Ser2、pSVA Ser4、そしてpSVA Ser 2ねよびpSVA Ser4感染細胞からのならし培地を、濃綿、防塩し、αレセプタとの結合をテストするために「3 1-PDGF-AAと組み合わせた。図11Bは、共感染細胞の存在状況でのみ統合が生じたことを示す。これらの実験は、単一の線間バンドを持つPDGF二量体が機能的に活性であることも証明す

## 例18

PDGFレセプタと結合しないが、正常の経過と二量化を受けるに野生型PDGFと十分類似するPDGF変異体を生成した。PDGF-0と呼ぶ変異体を次

のように調製した。PDGFーA鎖の超スプライス形をコード化し、上配例12 で言及したペクターpSV7d-PDGF-A(ペツショルツ他、ネイチャー3 20:695~699 (1986) (Betsholtz et al., Nature320:695-699(1 986));イストマン他、ジェイ・パイオ・ケム263:16202~16208(1988)も参照 (1988) (Oestman et al., J. Bio. Chem. 263:16202-16208(1988)も参照 )を使用した。PDGF-Aの短スプライス変形をコード化する1.3キロベースのcDNAを周

154:367~382 (1987) (Nunkel et al., Meth. Enzymol 154:36 989):リュング他、サイエンス246:1306~1309(1989)( Keck et al., Science 246: 1309-1312 (1989): Leung et al., Science 246: 1 . 突然変異誘発を行い、ケック他、サイエンス246:1309~1312 (1 イトジェンVEGF/VPGに置換した。トルエット他、DNA:333~34 。以下でpSV7d-PDGF-Oと呼ぶ生成された構造にたいして、配列が正 しいことを検証するために、通常のDNA配列分析を行った。要約すると、生成 された構造p SV1dーPDGFー0は、アミノ酸156~162つまりEYV 知のベクターMI3にクローン化した。その後、クンケル也、メス・エンジモル 7-382 (1981)) に従って、クンケル他、メス (Kunkel et al., Meth.) に従って 9 (1985) (Truett et al., DNA 4: 333-349 (1985)) に配載され、先行す る例で貫及したように、その変異DNAをベクターpSV7dにクローン化した R K K P か K P H Q G Q H に置換された P D G F - A の短スプライス変形をコー 306-1309 (1989)) に記載されたように、アミノ酸156~162を内皮細胞マ ド化した。この選択はいくつかの要因にもとづく。第一に、 置換された配列は、 PDGF-Bレセプタに結合することが示 されたPDGF-B鎖の2つの部位の一方と幾分オーパラップする(イストマン他、ジェイ・パイオ・ケム266:10073~10077(1991)(Gest man et al., J. Bio. Chem. 266:10073-10077(1991))。第二に、その部位は親か性で、これは分子での英国韓出を示唆する。最後に、PDGFとVEGF/V

(36)

(32)

P F 間のシステイン残基が完全に保存されることが以前に観察されており、これ は置換された配列がタンパク質構造全体に対して干渉しそうもないことを示唆す

## 函19

1を、10%ウシ胎児血滑と抗生物質で補足したダルベッコス (Dulbecco's) 最 少必須培地で培養した。イストマン他、セル・レグル2:503~512(19 91) (Oestman et al., Cell Regul. 2: 503-512(1991)) の雑数カルシウム讯 で、構造の10μgサンプルと60mmの回あたり0.5~1×106の細胞を 上記例18に記載したベクターの調製後、その構造を真核細胞の感染に使用し Collection) か5ATCC(CRL1650)として入手可能な細胞系COS— た。アメリカン・タイプ・カルチヤー・コレクション(American Type Culture 使用して細胞を感染させた。 pSV7d-PDGF-Aを

使用して平行培養も設定した。培地に [35 S] システインを加え、すべての培養 を4時間代謝標識した。

セル・レス136:255~261 (1981) (Heldin et al., Exp. Cell R 回洗った。そして、ビーズを緩衝液(4%SDS、0.2MトリスHC1、pH リクローナル抗血清を使用した。免疫沈降を4℃で一晩行った。免疫沈路物を収 集するためにタンパク質AセファローズCLー4Bを使用した。これらのピーズ を沈降物含有物質とともに45分間保持した後、緩衝液(1%トリトンX-10 0、20mMトリスHC1、pH7. 5、0.5m塩化ナトリウム、5mg/m **ールブルー)中で95℃で4分間加熱することによって、免疫複合体を溶離させ 培養後、ならし培地を取除き、細胞を溶解した。培地と溶解物の両方に対して** 1のBSA、0.1%SDS)で4回、20mMトリスHC1、pH7.5で1 た。一部のサンプルに対して、10mMのジチオトレイトールを使用して、95 8.8.0.5Mシュークロース、5mMのEDTA、0.01%プロモフェノ es. 136: 255-261 (1981)) すべてのPDGF-Aイソ型を認識するとされたポ 免疫沈降実験を行った。これらの実験では、以前に(ヘルディン他、エクスプ °Cで2分間還元処理も行った後、50mMのヨードアセトアミドでアルキル

化を行った。

アクリルアミドを含むゲル中でのSDSゲル電気泳動処理を行った。ゲルを「ア ンプリファイ (Amplify) 」に殴してむら、ハイパーフィルム (Hyperfilm) MP 還元または非還元条件にかかわらず、すべてのサンプルに対して、14%ポリ に臨光した。 図13に示す結果は、pSV7d-PDGF-Oが、約30kDaの分子園の 分泌二量体に処理される分子を生成することを示す。以下PDGF-00(二量 **本)と呼ぶこの分子は、PDGF-AAと同程度の大きさである。その単量体は** 以下PDGF-02序点

### 例20

ル・フポシトリ、カムデン、コュージャージー (Human Genetic Mutant Cell Re PDGF-00ホモニ量体の結合特性を調べた。そのために、感染細胞(pS GF — A A 競合するかを判定した。実験では、細胞系 A G 1 5 1 8 、ヒト包皮縦 **維芽細胞系、様代10~25(ヒューマン・ジェネティック・ミュータント・セ** VTd-PDGF-0;pSVTd-PDGF-A)からのならし培地と模擬感 染細胞を分析して、分泌生成物かPDGF-Aレセプタとの結合で<sup>125</sup> I-PD pository, Camden, N.J.) から入手)を使用した。細胞を24ウエルプレートで増殖させ、0.5m1の結 ng/ml)、 (a) 模擬感染細胞、 (b) pSV7d-PDGF-A感染細胞 または (c) p S V 7 d - P D G F - O 感染細胞からの 2 4時間ならし培地のひ 合緩衝液 (1mg/mlのBSA、0.9mMのCaClzおよび0.5mMの Mg C 1 2を含むP B S)で1回洗ってから、非標轍 P D G F − A A(0~1 6 pH7. 5、および10%(v/v)ゲリセロール中で常温で30分間保持して で、0℃で2時間保持した。培養を氷冷却結合緩衝液で4回洗った。細胞会合12 とつとともに、125 1練費PDGF-AA (2ng/ml、47cpm/mg) i1放射能を、0.2m1の1%トリトンX-100、20mMトリスHC1、 **抽出した。標準ガンマカウンタで放射能を測定した。**  図14に結果を示す。pSV7d-PDGF-A感染細胞からの培地は約15

(38)

0ng/mlのPDGF-AA活性を含んでいたが、pSV7d-PDGF-O感染細胞からの培地は顕著な活性が見られなかった。この実験は、PDGF-A $\delta$ のアミノ酸156~162の対応配列VEGP/VPPによる置換がPDGFadLセプタに対する結合の度光につながることを示している。

#### 0

ペックマン他、サイエンス241:1346~1349 (1988) (1988) (Beckmann et al., Science 241:1346-1349 (1988)) とフレミング他、プロケ・ナトル・アカト・サイ・USA86:8063~8067 (1989)) による以前の研究は、N1H 3T3細胞におけるとトPDGF~Bの発現が、内因性PDGFレセブタの自己分泌活性化による細胞感染を生じることを示した。従って、PDGF~O鎖の発現によって、レセブタと結合するが、レセブタの二量化を許さないPDGF~OBの発現によって、レセブタと結合するが、レセブタの二量化を許さないPDGF~Oサストに、PDGF~B鎖を発現するN1H 3T3細胞(以下「S153T3」と呼ぶ)を使用した。その細胞に、上EDSV7d~PDGF~O構造と、ピュロマイシン抵抗の指標であるpSV2pacを共感染した。ウエスタマ~ク他、ブロク・ナトル・アカド・サイ・USA87:128~132 (1999)) のエレクトロボラテイン法で、40µgのpSV7d~PDGF~Oと1µgのpSV2pacを使用して、細

間を感染させた。48時間後、始地に0.8μg/mlのビューロマイシンを含めることにより細胞を選択した。耐性クローンは、0.5μg/mlのビューロマイシンと400μg/mlのゲコチシンで補足した培地で培養した。

そして、上記の免疫対降法を使用して、約20の耐性ケローンだついてPDG F-0生成を分析した。

図15に示すように、対線細胞溶解物に40および24kDaの成分が検出され、 塔地には何も検出されなかった。ピューロマイシン耐性クローンの約半分が

、溶解物と培地の両方に約30kDaの新PDGF成分を持っていた。これは、 いかなる公知のPDGF-BBホモ二量体とも一致しない。下記の研究で、それ がヘテロダイマーPDGF-OBとされた。

#### 7.7

例21で報告した結果にかんがみ、PDGFイン型符異的抗血清を使用して免疫 过降研究を行った。そのような物質は、例えばサイバーグ他、ジェイ・セル・サ イ97:219~229 (1990) (Thyberg et al., J. Cell Sci. 97: 219 -229(1990)) に配載されている。加えて、PDGF-Aのアミノ酸156~16 9に対応するペプ チドに対する抗血溝 (ハマチャー他、ジェイ・バイオル・ケム263:16493~3~16498 (Hammacher et al., J. biol. Chem. 263: 16493~16498(1988)) を使用した。 免疫沈降のプロトコールは、ペプチド特異的抗血溝の使用前に、s 1 s 3 T 3 細胞の培地を、1 0 m M のジチオトレイトール(DTT)で、3 7 ℃で2時間、5 0 m M のヨードアセトアミドで、中性p H、常温で0. 5時間処理した以外は、上記のものとまったく同じであった。

これらの結果を図16に示す。

3つの細胞系に還元条件を使用して30kDaの物質(いわゆる「C15」、「C111」および「C118」)を生成すると、抗AAおよび抗BB抗血清は同様な結果を生じた。その沈降物は、PDGF-Aのみを生成する細胞系、つまり細胞系A172、のなちし培地からの抗AAによって沈降した物質および抗BB抗血清を使用してs1s3T3から沈降した物質と同じ大きさであった。2つの抗血清による認識は、30kDaの物質がPDGF-OBへテロダイマーであることを示唆している。

これらの実験は、PDGF-ABペテロダイマーが形成される可能性を首無にしたわけではないので、ペプチド156~169に対する抗血剤について調べた。 図示

しない結果において、抗血清はPDGF-A鎖を結合するが、感染COS細胞に

(40)

よって生成されるPDGF—Oを結合しないことが判明した。抗血清をA172についてテストすると、16、17および23kDaの成分、つまりPDGF—Aの3つの形が見いだされた。クローン5、11および18からの培地には、そのような形が検出されなかった。

この研究から引き出される結構は、抗AAおよびBB抗血剤の両方が感染sis3T3細胞中に認識する16、17および23kDaの成分がPDGF-〇のCDNAの生成物であり、これらの生成物がそのような感染細胞におけるpDGF-OBヘテロダイマーである、ということである。

#### 65

sis3T3細胞がPDGF-Oを生成し、変異体がPDGF-Bと会合してPDGF-OBヘテロダイマーを生じることが判明したので、変異体がsis3T3細胞の公知の感染表現型に影響するか镅べた。

P D G F 一 O を生成した上記感染からの3つのクローン(以下「C I I I 」、「C I 6 I および「C I I 9 I)と、その分子を生成した3つ(上配C I 5、C I I 1お

よびC118)を比較した。比較では、細胞形態、成長率および軌葉天でのコロニー形成の3つのパラメータを使用した。

最初のパラメータに関して、図17でクローンを比較している。非生産者(C 11、6、19)はスピンドル形で、縦横の成長パターンを示すが、その両方と も形質転換細胞の典型である。これに対して、C15、11および18は、単層 成長の監然としたパターンであった。 クローンの成長率を評価するために、10%ウン船児血清で14日間増補したダルベッコス最少必須路地(DMEM)で細胞を培養した。7日目に培地を変えた。これちの実験のグラフを図18に示すが、これは重複実験の平均値を表している。PDGF-0生成細胞と比べて数が4倍減少した。各グループ内の3つのクローン間に大きな相逢はなかった。

**軟寒天でのコロニー形成は、10%FCSと0.3%低温ゲル化アガロースと** 

、同じ培地の0. 5m1の闇の上の50g/m1のPDGF-BBあるいはそれ無しで、そして0. 6%低温アガロースで補足された0. 5m1のDMEM中で、12のウエル回に5×10<sup>4</sup>細胞/mg

を塗布して調べた。皿を3週間監視した後、顕微鏡写真撮影し、細胞を数えた。 細胞の計数値を下の表5に示す。さらに、図19は上記顕微鏡写真を示している。 PDGF-04ガティブのクローンは50,000個の細胞あたり87~124のコロニーを形成したが、ポジティブのクローンはコロニーが見いだせなかった。 PDGF-Bを加えると、PDGF-0生成細胞は、ネガティブの細胞と同レベルでコロニーを生成したが、そのコロニーはより小さいものであった。 従って、PDGF-0発現が、軟寒天でコロニーを形成するs1s生成細胞の能力を阻害した、との結論に達する。PDGF-BBの存在状況でのコロニー形成は、コロニー形成の欠乏がPDGF刺激に対する応答性の全体的整失によるものではないことを明示している。

表5 PDGF-Oポジティブおよびネガティブ sis3下3クローンの転換天でのコロニー形成

	PDGF-0	* ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~	# ジティブ PDGF-0 クローン 5 II IB	PDGF-0 7 5 7 7 1 1 6 19	* ガガラ	1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1
媒介	Þ		0	88	87	124
PDGF-BB (50 ng/ml)	ᅙ	85	92	ď.	16	K.

数字は5×104個の細胞当りのコロニーを表し、三通りの決定の平均で、

1 S. D. < 0. 14。 N. D. は不明を表す。

上記実験は、PDGF鎖由来の種々のペプチドと変成ペプチドがPDGF分子に対するアンタコニストおよびアゴニストとして作用することを示している。好値なアンタゴニスト的ペプチドは、PDGF-B鎖の2つの部

(42)

その配列はいずれの野生型PDGF単量体にも見いだせない。 そのようなペプチ 位からのエピトープを含有する。そのようなペプチドはアミノ酸配列を持つが、 ドの好適な科は、次の式で表すことができる。

Ala Asn Phe Leu Val X (Y) n

Glu lie Val Arg Lys Lys

nは0か535の整数である。特に好適なアンタゴニストは本書で「16」およ ここで、Xはトリプトファンまたは変成トリプトファン、Yは任意のアミノ酸、 ひ「16丁」と呼ぶペプチドで、それぞれ下記のアミノ酸配列を持つ。

Ala Asn Phe Leu Val Trp Glu lle Val Arg Lys Lys Pro

Ala Asn Phe Leu Val Xaa Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro

レセプタ結合に関する P D G F との競合で、はるかに効率がよい。 トリプトファ ここで、X a a はチオアニソール化トリプトファンを表す。ペプチド16Tは、 ンが2ーニトロフェニルスルフェニルに結合した変形16NPT

ミノ酸の更なる欠失は、ペプチドの不溶性化をもたらし、従って評価できなかっ 活性である当初のペプチド16に優る理由は容易に説明できない。 上記13アミ ノ酸配列が阻害/アンタゴニスト活性の鍵のようである。上記のようなC末端ア も、アンタゴニストとしてペプチド16より活性である。このような誘導体が、 た。N末端での切断は活性の喪失を生じた。

Δ266:10073~10077 (1991) (Destman et al., J. Bio. Ch 以前の斑究で、ペプチドのβ鎖のアミノ数105~144が、βレセプタとの  $1 \sim 1\ 5\ 4\ 4\ (1\ 9\ 9\ 0)$  (LaRochelle et al., Science 248: 1541-1544(1990 154および11e-158が特定された (イストマン他、ジェイ・バイオ・ケ 相互作用に重要なことが示された(ラロッシェル他、サイエンス248:154 )))。さちに別の研究で、結合に重要なものとしてAsn-115、Arg-

ミノ散116~121および157~163を含み、従ってイストマン他に重要 体はaおよびβレセプタの両方との結合を阻骜するという、この分野の先行研究 em. 266: 10073-10077(1991)))。特に好適なペプチド1 6 はPDGF-Bのア であると特定されたものに近いいくつかのアミノ酸を含む。しかし、発明の誘導 で認識されなかった性質をもつ点に 留意しなければならない。また、本書で提示された証拠は、ペプチド構造のわず かな改変でも、アンタゴニスト的活性に深遠な影響を及ぼす。そのようなペプチ Fのアンタゴニスト的効力は、過剰な、あるいは望ましくないPDGF活性によ り特徴づけられる症状での使用を示唆する。これらの症状は、上配「背景」的に 記載したもの、そして慢性の炎症状態を含む

ck et al., Science 246: 1309-1312(1989); Leung et al., Science 246: 1306 因子またはVEGF:ケック他、サイエンス246:1309~1312(19 PDGF-Bについての観察結果に関連して、血管内皮成長因子(血管透過性 -1309 (1989)) を参照) および胎盤成長因子 (マグリオン他、PNAS88:9 ) )を含む他の分子が、PDGF-Bのものと同等のシステイン構造を示すこと に留意しなければならない。本書で示される観察結果は、構造的類似性がある場  $267 \sim 9271 \ (1991) \ (Maglione et al., PNAS 88: 9267-9271 (1991)$ 89);リュンガ他、サイエンス246:1306~1309 (1989) 合の、これら他の分子との相関を示唆する。

P D G F ー A 単量体は変成 P D G F ー B 単量体ほどの活性がまったく無かった が、 部分還元されたアルキル化

PDGF-A単量体は、ある程度の活性を示した。

上記の例は、特に、PDGF二量体の形成に関与するクロス分子結合の特異的 パターンが存在することを示している。この観察結果は、アンタゴニスト的二量 --A Bの生成を制御できる。二量体におけるクロス結合の認識により、二量体が 体分子を形成する能力についての観察結果とともに利用できる。例えば、鎖のひ とつがアンタゴニストを生成するよう変成された場合、ヘテロダイマーPDGF

単一の分子間結合のみを含むという唯一の制約の下で、専ちPDGF-ABの形を生成できる。第2または第4の野生型位置でシステインが欠けているひとつの単量体をコード化する核梭分子と、他のリストされた野生型システイン位置でシステインが次けている別の分子との細胞への共感染は、PDGF-ABの高い生成を保証する。例えば、第1の配列が、第2位置にシステインがないPDGF Aと、第4位置にシステインがないPDGF Bとをコード化する場合でも、PDGF-ABの二量体が形成される。他方、必要な第4システインは存在するが、第2システインが消えているので、二量体のPDGF AAは形成されない。同様に、そのようなシステムにPDGF BBはで

きない。第2システインと第4システインがない以外は変成されていない、核酸配列の共感染によっても、当然ホモ二量体形を生成できる。また、それぞれが異なる核酸配列を持った2つの別個の細胞サンプルを感染させて、例えば倍地で二重化を引き起こすこともできる。従って、発明のひとつの側面は、別々の核酸部分が望ましい単量体をコード化する、上記二量体生成のためのキットにある。

従って、本発明は、本書に配載の原理に従って生成された。つまり単一の分子 間ジスルフィド結合を持ったアンタゴニスト二量体を包含する。システイン残基 用に配述されたアミノ酸位置は、別のアミノ酸の置換、欠失、遮断等で単に変成 を必要とするだけである。そのような P D G F A A 分子は結合で統合すること が確明されている。これらの分子からアンタゴニストを脱計でき、そこではひと つの嫌が、例えは位置156~162におけるレセブタへの結合を防止するよう さらに変成される。これは、いずれかの分子のシステイン2またはシステイン4 を変成することで、野生型鏡を持った特異的ヘテロダイマーの形成に使用できる

また、上配開示は、PDGFに対するアンタゴニストとして機能する種々のアミノ酸合有分子の開発を教示し

ている。これらの分子のあるものはPDGF-Aに、他のものはPDGF-Bに

指抗する。アンタゴニストは単量体でも二量体でもよい。とくに興味を引くのは、単一のシステイン結合によってつながれた二量体と、PDGFーAまたはPDGFーBのアミノ酸156~162によって形成される卵位が何らかの形に変成された分子である。本書で使用する「変成」は最も広い意味を持つもので、全体的または断分的欠失、および他のアミノ酸による部分的または全体的置換を含む。他の配列による置換に関し、配列KFHQGQHが特に望ましい。しかし、アミノ酸の同類間換と、これらアミノ酸のいずれか又はすべてを同類環境で交換することが本発明に含まれることは明かである。

上記変成を含有するアンタゴニストは単量体または二量体の形で使用でき、本書で「PDGF-OB」と呼ぶ二量体分子が特に望ましい。しかし、アミノ酸の同類置換と、これらアミノ酸のいずれか又はすべてを同類置換で交換することが本発明に含まれることは明かである。

上記変成を含有するアンタゴニストは単量体または二量体の形で使用でき、本書で「PDGF-0B」と呼ぶ二量体分子が特に望ましい。そのようなすべての二量体のPDGFアンタゴニストは、PDGFレセブタと結合

することと、これらのレセブタの二重化を阻害する能力によって特徴づけられている。レセブタの二重化はPDGF活性、従ってアンタゴニスト効果に必要である。本書に記載したアンタゴニストは、例えば、それをコード化する核酸配列の発現を通してつくれる。これらの配列はブラスミド等の発現ペクターに組み込め、これによってコード化配列がプロモーターに作用的に連鎖する。発現ペクターおよび核酸配列自体、アンタゴニストを製造する細胞系を生成するよう、感染剤として機能できる。COS細胞等の真核細胞が望ましい。

本発明のアンタゴニストが二量体の形で使用できることを以上で指摘した。二量体を使用する場合、一方の単量体が正常のPDGF単量体で、他方が突成されることが望ましい。そのような二量体は、1つの正常なPDGF分子と1つの変成された分子を生成する宿主細胞を使用して、組替えで生成できる。二量体は、例えば適当な核酸の共感処、または第2の変成分子をコード化する核酸を持った1つの正常なPDGF分子を再生する細胞の感染によって生成できる。PDGF1つの正常なPDGF分子を再生する細胞の感染によって生成できる。PDGF

(45)

他は、この出願に概要を示したような、公知のものである。発明の他の側面は当 、対象におけるPDGF-Bの悪影響を抑制する方法であって、PDGF-Bの 影響を抑制するに十分な量のPDGF-Bアンタゴニストを対象に投与すること からなるものである。細胞の形質転換はひとつのそのような悪影響である。その その最も広い意味において、そのようなキットは、望ましくは発現ベクターの形 の、両方のPDGF単虫体の核酸配列を含む。また、そのようなキットは、当業 DGF-Bに対するアンタゴニストの投与を通して、PDGF-B連鎖細胞の形 質転換を緩和し、復帰できることを示している。従って、発明のひとつの側面は 者に知られているような、細胞の感染に有用な追加的試薬を含むてとができる。 上記で含及したような本発明のアンタゴニストの他の用途に加えて、例は、 業者に明かであり、詳述を必要としない。

うな用語や表現の使用に、示され記載された特徴またはその一部のいかなる均等 探用された用語や表現は説明のためで、限定を意図したものではない。そのよ 物をも除外する意図はなく、発明の範囲内で種々の改変が可能である。

H .. ~·· (1) 一般情報: (i) 出願/

'n : 血小板由来の増殖因子アンタ スト 筷 の 谷 断 絥

: 1 1 (iii) 配列の数

(vi) 現在の出願データ: (A) 出願番号: 07/977,234 (B) 出願日: 1992年11月16日 (C) 分類: 514

(viii) 沖理士/代理人情報: (A) 氏名 : ハンソン, ノーマン・ディ (B) 登録番号: 30,946 (C) 参照/曹類番号: LUD 269.1

688-9200 838-3884 (212) (212) .. К (ix) 通信情報: (A) 電話 : (B) ファックス

(2)配列認識番号」の情報:
(i)配列の特徴: 14アミノ酸(b) 性類: アミノ酸(b) 性類: アミノ酸(b) 仕相: 直線(ii) 分子の種類: タンパク質(xi)配列の記述: 配列認識結号::

Ala Asn Phe Leu Val Trp Xaa Glu Ile Val Arg Lys Pro 5

(2) 配列認義者号 2 の情報: (i) 配列の特徴: (b) 複数: 14アミノ酸(B) 積額: アミノ酸(D) 位相: 0 アンペケ質(II) 分子の積類: タンパケ質(Xi) 配列の記述: 配列認識語号 2:

<u>ښ</u>

Ala Asn Phe Leu Val Xaa Xaa Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro 5

ンパク列認識 (2) 配列認識番号 3 の倍報: (1) 配列の特徴: (A) 長さ: 137 \* 7 敬 (B) 植類: ア \* 7 放 (I) 仕相: 直線 (xi) 分子の種類: タンパク

.: :: 阜 質蓄 Ala Asn Phe Leu Val Trp Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro S

数タンパク質 配列認識番号 (2) 配列認業番号 4 の情報: (1) 配列の特徴: (A) 長さ: 137 \* / 16 (B) 植類: アネノ酸(D) 位相: 直線 アンパ(11) 分子の種類: カンパ(x1) 配列の記述: 配列認

号 4:

Ala Asn Phe Leu Val Xaa Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro 5

の情報 (1) 配列認識番号 5 の (1) 配列の存録: (A) 点は: 2% (B) 格類: アミ (B) 位相: 直線 (il) 分子の種類: (xi) 配列の記述:

29アミノ酸アミノ酸 14条 14条

卟 タンパク質配列認識番点

5:

Ala Amn Phe Leu Val Xea Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Leu Arg Pro 5

Val Gln Val Arg Lys lle Gly 11e Val Arg Lys Lys Pro 20

(20)

特表平8-500010

(2) 配列認識器号 6 の情報:
(i) 配列の特徴: 29アミノ飯(B) 種類: アメノ酸(D) 位相: 直流(D) 位相: 自流(D) 分子の種類: タンパク質(xi) 配列の記述: 配列認識語号 6:

Ala Asn Phe Leu Val Irp Pro Pro Cya Val Glu Val Gln Leu Arg Pro 5 val Gin Val Arg Lys, ile Gly Ile Val Arg Lys Lys Pro 20

(2) 配列認識番号 7 の情報: (1) 配列の特徴: (A) 長さ: 125アミノ酸(B) 植類: アミノ酸(D) 植類: アミノ酸(D) 位相: 直線(I) 分子の種類: 配列認識替

\*\*\*,タンパク質 配列認識番号 7:

13b. The Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys Asn 35 . 40 Ser lie Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr Val Ile 5 Tyr Glu Lie Pro Arg Ser Gin Val' Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe Leu 20 A. 30 ぐ

Sec Leu Amn Pro Amp Tyr Arg Glu Glu Amp Thr Gly Arg Pro Arg Glu Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Lys Lau Lys Clu Vel Cin Vel Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala Thr Thr The Ser Ser Val Lys Cys Cln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val

Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu Lys Pro Thr 115 125

. . . . . .

欰 (2)配列設織番号 8 の情報:
 (1)配列の特徴:
 (B) 独立: 1257 : / 砂(B) 権額: 7 : / 砂(D) 位相: 直線 9ンパク質(ii) 分子の種類: 8ンパク質(xi)配列の記述: 配列認識器号

.. 8

Ser Ile Clu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr Val lle 5

Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thx Ser Ala Asn Phe Leu 20 ile Drp Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys Asn 40 45

The Ser Ser Val. Lys Cys Cin Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val 50 60.

Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Pro Lys Leu Lys Glu 65 80 Val Gin Val Arg Leu Glu Glu His Leu Gly Cys Ala Cys Ala Thr Thr 90 95 Ser Leu Aon Pro Aop Tyr Arg Glu Glu Aop Thr Gly Arg Pro Arg Glu 100

Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Lau Lys Pro Thr 125

[<u>M</u>1]

特表平8-500010

(21)

(2) 配列認識番号 9 の情報:
 (i) 配列の特徴:
 (b) 長さ: 1257 × 7 酸(B) 種類: アミノ酸(D) 位相: 直線(D) 位相: 直線(D) 分子の種類: カンペク質(X)) 配列の記述: 配列認識番号 9:

Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Xas Lys Thr Arg Thr Val Ile S

Tyr Gly 11e Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Man Phe Leu 20 20

lie Trp Pro Pro Cys Val Gly Val Lys Arg Xaa Thr Gly Xaa Xaa Asn 35

Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys Glu 65 90 The Ser Ser Val Lys Xas Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val SO SO Val Cin Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Xas Ala Xaa Ala Thr Thr 90 95

Ser Leu Ann Pro Amp Tyr Arg Glu Glu Amp Thr Gly Arg Pro Arg Glu 100

Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu Leu Pro Thr 120 125

280nmt0 吸光度

0.5

ឧ

保持時間 (分)

9

0.

アセトニトリル (%)

8

<del>2</del>

8

1.5

8

(2) 配列認識番号 10 の情報: (i) 配列の特徴: 7 ア ミノi (A) 長さ: 7 ア ミノi (B) 恒緒: アミノ酸 (1) 位相: 直線 タンパ (xi) 配列の記述: 配列認認

- タンパク質 - 配列認識番号 10:

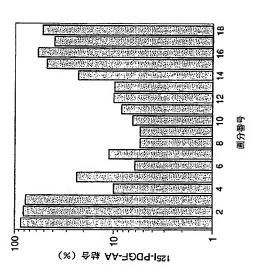
Gly Tyr Val Arg Lys Lys Pro

7 アミノ酸 アミノ酸 直線

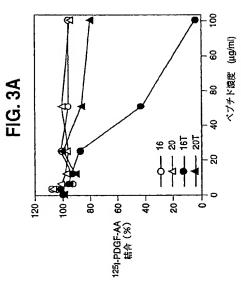
タンパク質 配列認識番号 11: (2) 配列認識番号 11 の情報: (1) 配列の特徴: 1アミノ酸(A) 長さ: 7アミノ酸(B) 佐瀬: アミノ酸(D) 佐相: 直線(ii) 分子の種類: タンパク(xi) 配列の配述: 配列認識

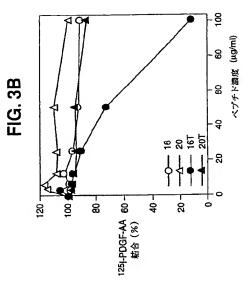
Lys Pro His Cln Gly Gln His



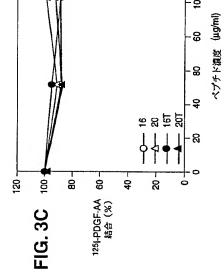


[M3B]

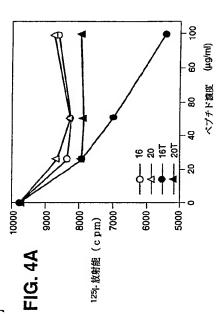


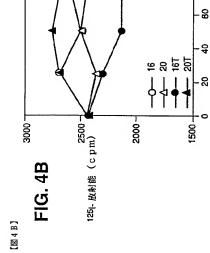






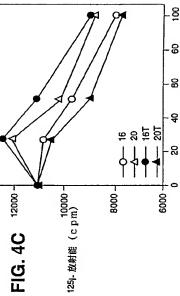
[X 4 A]





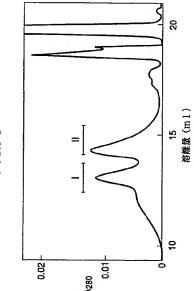
[×4 C]

ペプチド濃度 (μg/ml)

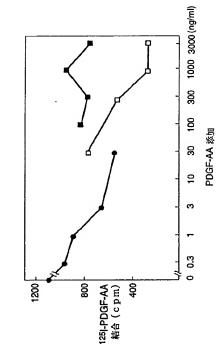


ペプチド嶺度 (μg/ml)









- 97

- 49 — Z6

- SOS

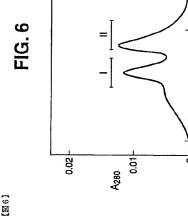
6-01 x 1M

ペスチド (prg) DSS

PDGF (100ng)

開校

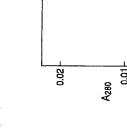




[X6A]

47+ 16

FIG. 5





 $\Box$ 

+ + +

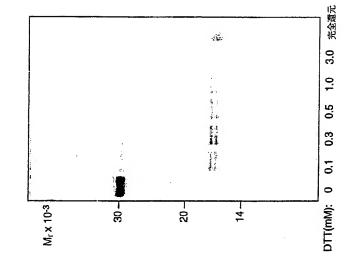
191 ソキケン

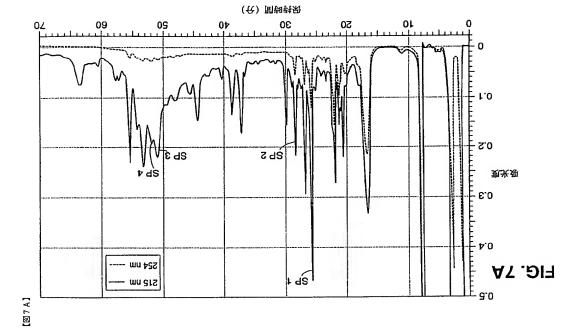
ペンチド 20

(09)

特表平8-500010







(62)

特表平8-500010

FIG. 7B

SIEEAVPAVCKTRTVIYEIPRSQVDPTSANFLIWP YVRKKPKLKEVQVRLEEHLECACATTSLNPDYREE sp2@-@------

DTGRPRESGKKRKKKKLKPT

FIG. 8A

M<sub>r</sub> x 10·3 龟 8 46

ı

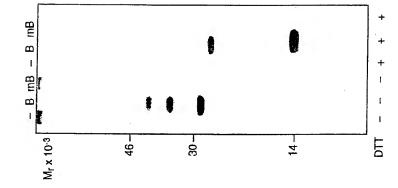
14

[88A]

(63)

特表平8-500010





[68]



特表平8-500010

(64)



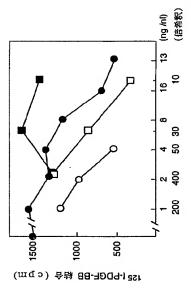
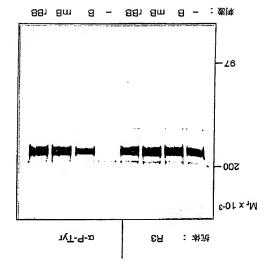


FIG. 10A

[M10A]

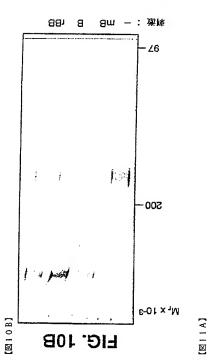


(B11.B) FIG. 11B

2500



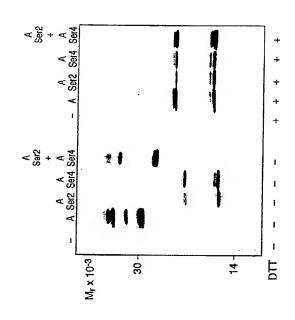




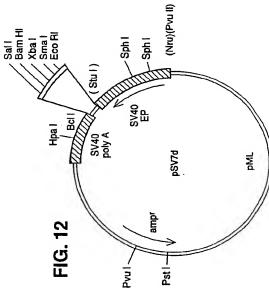
125i-PDGF-AA 結合(c p m) 1500 -

2000

FIG. 11A







20 (ng/ml) (倍希釈)

9

200

1000

16 (ng/ml) 3 (倍希釈)

27

Lys. Med.

Lys. Med.

T10-

14-

+ DTT

● pSV7d-PDGF-A □ pSV7d-PDGF-D ■ モック (疑似)

O PDGF-AA

1251-PDGF-AA 結合(c pm x 1 0−²)

FIG. 14

特表平8-500010



FIG. 13

0

⋖

0 ¥

0

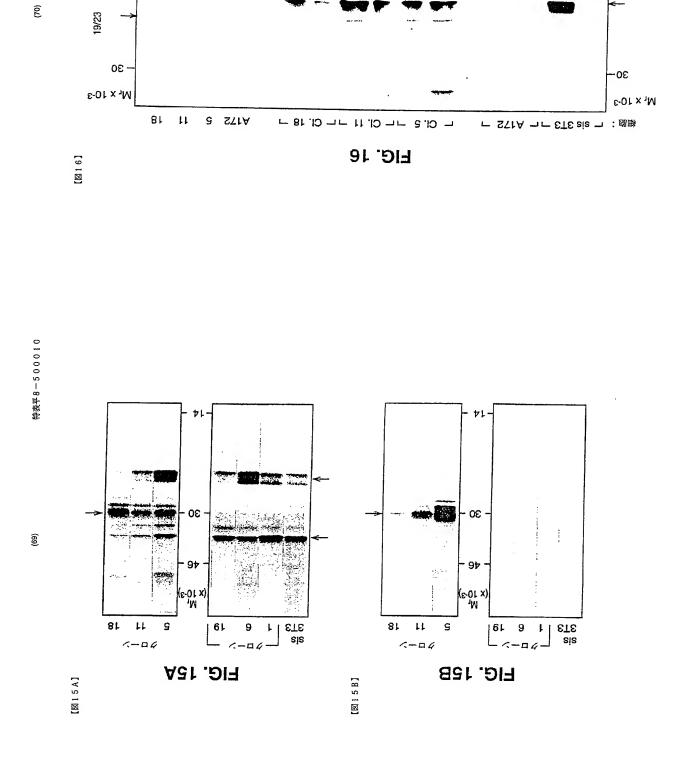
∢

0 ¥ (x 10-3)

- 46 -

- 30 -

PDGF 鎖:



**71**-

×キャン酸−A ---

88

88 AA

88

88 AA

88

 $\forall \forall$ 

: 衛血流

(72)

(71

[M17A]



FIG. 17C



PIG. 17D

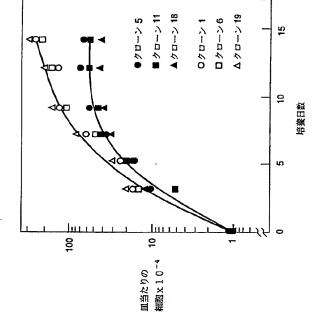
[図18]

特表平8-500010

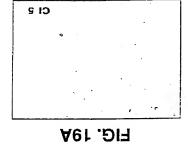
(73)



HG. 17E

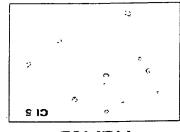


[A 6 1 🛛]



[Ø17F]

FIG. 17F



Ger .917

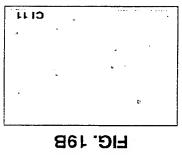
LI 13

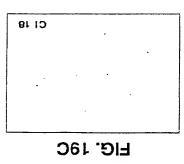
크61 .DIH

[M 1 9 D]

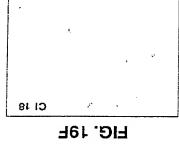
特表平8-500010

(75)





[M19F]



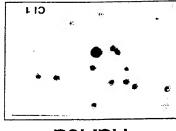


FIG. 19G

[M19C]

[H 6 1 ⊠]



9 10

[[1818]

61 10

FIG. 191

(78)

(62)

# 【手続補正書】特許法第184条の7第1項

[提出日] 1993年9月7日

【補正内容】

# 補正特許精求の範囲

[1993年9月7日(07.09.93)に国際事務局が受領; 当初の請求項1~84が補正請求項1~43に替えられ、そのうち請求項1、2、16~18、21、22、24、26、28、29、32~40、42~54、62~64、66、68~73、75および77~84が削除され、新請求項6~8、2

2~28、30、37および39~42が追加された(5ページ)]

- 血小板由来の増殖因子に対する以下のアミノ酸配別からなるペプチドアンタゴニスト Ala Asp Phe Leu Val Xaa Xaa Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro、ここで、最初のXaaはトリプトファンまたは姿成トリプトファン、2番目のXaaはのから35アミノ酸のいずれかである。
- 2番目のXaaが0アミノ酸である構求項1のアンタゴニスト。
- 最初のXaaがトリプトファン、チオアニソール化トリプトファンまたはトリプトファンの2ーニトロフェニル塩化スルフェニル誘導体である請求項1または20アンタゴニスト。
- 4. 2番目のXaaがPro Pro Cys Val Glu Val G In Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys I le

である請求項1のアンタゴニスト。

- 最初のXaaが チオアニソール化トリプトファンか2ーニトロフェニルスルフェニルトリプトファン誘導体である請求項1のアンタゴニスト。
- 最初のXaaがトリプトファンである請求項1、2、3または4のいずれかのアンタゴニスト。
- 7. 請求項6のアンタゴニストをコード化する分離された核酸分子。
- 8. 請求項7の分離された核酸分子からなる、プロモーターに作用的に連鎖し

た発現ベクトル。

- 9. PDGFaおよびβレセプタを提示する細胞へのPDGF結合を阻害する 方法であって、前配細胞に対するPDGFBの結合を阻止するに十分な量の、 請求項1、2、3、4、5または6のいずれかのアンタゴニストに前配細胞を接触させることからなるもの。
- 10. いずれかの単菌体上のアミノ酸123か、いずれかの単菌体上のアミノ酸132の少なくとも一方かシステインでなく、前配変成二量体か野生型PDGFARに対するアンタゴニストである、分離された変成

PDGF AA二重体。

- 11. 一方の単量体上のアミノ酸123と他方の単量体上のアミノ酸132がシステインでない額求項10の分離された変成PDCF AA二量体。
- 12. いずれかの単重体上のアミノ酸124か、いずれかの単重体上のアミノ酸133の少なくとも一方がシステインでなく、前配変成二量体が野生型PDGFBBに対するアンタゴニストである、分離された変成PDGFBB二量体。
  13. 一方の単量体上のアミノ酸124と他方の単量体上のアミノ酸133がシ
- 14. (i) PDGF Aの単量体またはPDGF Bの単量体 と (ii) 非PDGF単量体が5なり、前配2つの単量体が1個のジスルフィド結合によってつながれ、前記二量体がPDGFアンタゴニストである、分離された二量体。

ステインでない錆求項12の分離された変成PDGF BB二量体。

- 15. 前記非PDGF単量体が増殖因子である請求項14の分離された二量体。
- 16. 前記非PDGF単量体がVEGFである勘求項14の分離された二量体。
- 17. アミノ酸位置156~162で変成されたPDGF

単量体からなる分離されたペプチド。

- 18 位置156~162にアミノ梭配列KPHQGQGを持つ請求項17の分離されたペプチド。
- 19. 前記単置体がPDGF Aである請求項17または18の分離されたペプチド。

(82)

20. 前配単層体がPDGF Bでおる請求項17または18の分離されたペプン。

- 21. 以下のものからなる分離された二量体、
- (1) PDGF AまたはPDGF-Bの一方、および
- (11) 請求項17、18、19または20のいずれかの分離されたペプチド
- 22. 2個の変成PDCF-A単置体からなり、アミノ酸123および132の少なくとも一方がシステインでないように前記単量体の一方が変成され、アミノ酸位置156~162で前記単量体の一方が変成された、分離された二量体。23. 2個の変成PDCF-B単量体からなり、アミノ酸124および133の少なくとも一方がシステインでないように前配単重体の一方が変成され、アミノ酸位置156~162で前記単量体の一方が変成された、分離された二量体。
- 24. 位置156~162で変成された単量体が、前配位置にアミノ酸配列KP HQGQHを持つ構求項22または23のいずれかの二量体。
- 25. 以下のものからなる分離された二量体、
- (1) (a) アミノ酸位置123および132の少なくとも一方で、前配位置の前記少なくとも一方がシステインでないように変成されたPDGF-Aと、
- (b) アミノ酸位置124および133の少なくとも一方で、前記位置の前記少なくとも一方がシステインでないように変成されたPDGF-Bのうちの一方、そして
- (11) 精求項17、18、19または20のいずれかの分離されたペプチド
- 26. 鞘求項7の核酸配列または請求項8の発現ベクトルに感染した細胞系。
- 27.前配細胞系にPDGF-AおよびPDGF-Bのいずれかをコード化する

核酸分子にさらに感染した簡求項26の細胞系

- 28.前記細胞系がPDGF-AまたはPDGF-Bの少なくとも一方を生成する間を項26の細胞系。
- 29. 請求項21、22、23、24または25のいずれかの二量体を生成する

のに有用なキットであって、

それぞれが前記二量体の単量体をコード化する1対の核酸分子からなるもの。

- 32. 位置124および133のアミノ酸がそれぞれセリンであるákx項31の分離されたアゴニスト。
- 33. 位間124および133のアミノ酸の一方がセリンである請求項31の分離されたアゴニスト。
- 34. 請求項31、32または33のアゴニストをコード化する分離された核酸 4.x
- 35. 請求項31、32または33のアゴニストをコード化するプラスミド。
- 3 6. 請求項3 4の分離された核酸分子または請求項3 5のプラスミドに感染し

た笛間系。

- 37. 鯖末頃30の分離された核酸分子からなる、プロモーターに作用的に連鎖した発現ベクトル。
- 38. p S V 7 d P D G F O で表される糖求項 3 7 の発現ベクトル。
- 39. 請求項31の核酸分子または請求項37または37

の発現ベクトルに感染した細胞系。

- 40. PDGFーBの悪影響を抑制する方法であって、PDGFーBの悪影響を抑制するために、請求項25のアンタゴニストの所定量を、それを必要とする患者に投与することからなるもの。
- 41. 前配題影響が細胞感染である精求項41の方法。
- 42. 前記アンタゴニストがPDGFOBである請求項40または41の方法。
- 43. 細胞に対するPDGF効果を増進する方法であって、前配細胞に対するPDGF効果を増進するに十分な置の、請求項31のPDGFアゴニストを細胞に投与することからなる。

(84

(83)

【手続補正書】特許法第184条の8

[提出日] 1994年4月25日

【補正内容】

## 精求の範囲

1. 血小板由来の増殖因子に対する以下のアミノ酸配列からなるペプチドアン タゴニスト Ala Asp Phe Leu Val Xaa Xaa u lle Val Arg Lys Lys Pro. ここで、最初のXaaはトリプトファンまたは変成トリプトファン、2番目のX aaは0か535アミノ酸のいずれかである。

- 2. 2番目のXaaがOアミノ酸である精水項1のアンタゴニスト。
- 3. 最初のXaaがトリプトファン、チオアニソール化トリプトファンまたは トリプトファンの2 ーニトロフェニル塩化スルフェニル誘導体である お項1ま たは2のアンタゴニスト。
- Ç In Leu Arg Pro Val Gin Val Arg Lys I 4. 2番目のXaaがPro Pro Cys Val Glu Val

である請求項1のアンタゴニスト。

- 最初のXaaが チオアニソール化トリプトファンか2ーニトロフェニル スルフェニルトリプトファン誘導体である崩求項1のアンタゴニスト。 . 2
- 最初のXaaがトリプトファンである精求項1
- 2、3または4のいずれかのアンタゴニスト。
- 7. 請求項6のアンタゴニストをコード化する分離された核酸分子。
- 8. 請求項7の分離された核酸分子からなる、プロモーターに作用的に連鎖1 た発現ベクター
- 請求項1、2、3、4、5または6のいずれかのアンタゴニストに前配細胞を接 9. PDGFaおよびβレセプタを提示する細胞へのPDGF結合を阻害する 方法であって、前配細胞に対するPDGF Bの結合を阻止するに十分な量の、 触させることからなるもの。

F AAに対するアンタゴニストである、分離された変成PDGF AA二量体 10. 一方の単量体上のアミノ酸123および他方の単量体上のアミノ酸132 のそれぞれがシステインでなく、前配変成PDGF AA二量体が野生型PDG

- 11. (1) PDGF Aの単量体またはPDGF Bの単量体 と(11) 非 PDGF単量体からなり、前記2つの単量体が1個のジスルフィド結合によって つながれ、前記二量体がPDGFアンタゴニストである、分離された二量体、
- 12. 前記非PDGF単量体が増殖因子である撤求項11の分離された二量体。
- 13. 前記非PDGF単重体がVEGFである請求項11の分離された二量体。
- 14.アミノ酸位置156~162で変成されたPDGF単量体からなる分離さ れたペプチド。
- 15. 位置156~162にアミノ酸配列KPHQGQGを持つ構求項14の分

離されたペプチド。

- 16. 前記単量体がPDGF Aである請求項14または15の分離されたペプ それ
- 17. 前記単量体がPDGF Bである椭求項14または15の分離されたペプ
- 18. 以下のものからなる分離された二量体、
- (1) PDGF AまたはPDGF-Bの一方、および
- (11) 請求項14、15、16または17のいずれかの分離されたペプチド
- 19. 2個の変成PDGF-A単量体からなり、アミノ酸123および132の 少なくとも一方がシステインでないように前配単量体の一方が変成され、アミノ 8位閏156~162で前配単量体の一方が姿成された、分離された二畳体。
  - 20. 2個の変成PDGF-B単量体からなり、アミノ酸124および133の 少なくとも一方がシステイン

でないように前記単量体の一方が変成され、アミノ酸位置156~162で前記

(86)

単量体の一方が変成された、分離された二量体。

- 21. 位置156~162で変成された単量体が、前記位價にアミノ酸配列KP HQCQHを持つ摘求項19または20のいずれかの二量体。
- 22. 以下のものからなる分離された二量体、
- (1) (a) アミノ酸位置123および132の少なくとも一方で、前配位置の前記少なくとも一方がシステインでないように変成されたPDGF-Aと、
- (b) アミノ酸位置12 4 および133の少なくとも一方で、前配位置の前記少なくとも一方がシステインでないように変成されたPDGF-Bのうちの一方、そして
- (11) 鷸求項14、15、16または17のいずれかの分離されたペプチド
- 23. 精求項1の核酸配列または請求項8の発現ベクターに感染した細胞系。
- 24.前記細胞系に P D G F ーA および P D G F ーBのいずれかをコード化する 核酸分子にさらに感染した額求項 2.3 の細胞系。
- 25. 前配細胞系がPDGF-AまたはPDGF-Bの

少なくとも一方を生成する精求項23の細胞系。

- 26. 請求項18、19、20、21または22のいずれかの二量体を生成するのに有用なキットであって、それぞれが前記二量体の単量体をコード化する1対の核酸分子からなるもの。
- 27. 舗求項14、15、16または17のペプチドをコード化する分離された核酸分子。28. 変成PDGF-B単遺体からなり、アミノ酸124および133がシステインでない、分離された血小板由来の増殖因子アゴニスト。
- 29. 位置124および133のアミノ酸がそれぞれセリンである請求項28の
- 分離されたアゴニスト。 30. 位置124および133のアミノ酸の一方がセリンである請求項28の分 雑されたアゴニスト。
- 31. 請求項28、29または30のアゴニストをコード化する分離された核酸

32. 趙求項28、29または30のアゴニストをコード化するプラスミド。

- 33. 簡次項31の分離された核酸分子または簡次項32のプラスミドが感染さ
  - れた細胞系。

- 35. p S V 7 d P D G F O で表される構求項 3 4 の発現ベクター。
- 3 6. 請求項28の核酸分子または請求項34または38の発現ベクターが感染された細胞系。
- 37. PDGF-Bの題影響を抑制する方法であって、PDGF-Bの悪影響を抑制するために、精求項23のアンタゴニストの所定量を、それを必要とする患
- 38. 前配悪影響が細胞感染である簡求項37の方法。

者に投与することからなるもの。

- 39. 前記アンタゴニストがPDGF0Bである精求項37または38の方法。
- 40. 細胞に対するPDGF効果を増進する方法であって、前配細胞に対するPDGF効果を増進するに十分な蠢の、精求項28のPDGFアゴニストを細胞に

投与することからなるもの。

(88)

# 【国際調査報告】

Chaton of document, with ladication, where appropriate, of the relevant passages	OCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	so dat base sensibod during be issonational search (name of data base und, where predicable, saarch terres sea and DAADG (ties 5, 155, 351, 357, 358) search terres: POOF, dines, bornotimer, belevatimer, systalm, disulfab Bethalt, estalgotist, apolitis	ankies seatel of other than subinum desumenation to the stant that such documents are included to the Boids searched	Perrossonal periodica No. Perrossonal periodica No. Perrossonal periodica No. Perrossonal periodica No. Perrossonal personal no periodica no periodi	15/18  10 to both makend character and PC  201.; 1047, 12; 30/150; 31, 199; 316/21.3  201.; 2147, 12; 30/150; 31, 199; 316/21.3  201.; 2147, 12; 30/150; 31, 199; 316/21.3  201.; 2147, 12; 30/150; 31, 199; 316/21.3  201.; 2147, 12; 30/150; 31, 199; 316/21.3  201.; 2147, 12; 30/150; 31, 199; 316/21.3  201.; 2147, 12; 30/150; 31, 199; 316/21.3  201.; 2147, 1992, 35c catize document, 18  201.; 2147, 1992, 35c catize document, 19  201.; 2147, 1992, 35c catize document, 19  202.; 31, 31, 31, 31, 31, 31, 31, 31, 31, 31,	CLASSIPICATION OF SUBJECT MATTER  12. 175-20. See Early 316-2.  13. 170-20. 2.170-2. 1.310.  14. 170-20. 2.170-2. 1.310.  15. 170-20. 2.170-2. 1.310.  15. 170-20. 2.170-2. 1.310.  15. 170-20. 2.170-2. 1.310.  15. 170-20. 2.170-2. 1.310.  16. 170-20. 2.170-2. 1.310.  170-	
010.	166		C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  C. Station of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  R. P. P.  WO, A, 92/11364 (PANQ) 09 JULY 1992, see entire document,  Y.P.  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 267, Number  16, issued OS June 1992, M. Andersson et al., "Axiginment of interchain Disulfide Bonds in Platelet-derived Growth Factor (PDGF) and Evidence for Agentst Activity of Monomeric PDGF; pages 11260-11266, see entire document.  V. C. A, 4,959,314 (MARK ET AL.) 25 September 1990, see entire document.			Dorr Columnicals are listed in the continuation of Box C. pools amprise of that denominate the first which is no continued to part of present and the first which is no continued to part of presents produced on or the international film, the	
WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1992, see catire document.  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 267, Number 16, issued 05 June 1992, N. Andersson et al., "Assignment of Interchain Disulfide Bonds in Planeterderived Growth Factor (PDGF) and Evidence for Agents Activity of Monomeric PDGF; pages 11269-11266, see entire document.  US, A, 4,959,314 (MARK ET AL.) 25 September 1990, see entire document.	WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1932, see cative document, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 267, Number 16, issued 65 June 1992, M. Andersson et al., "Assignment of Intervisin Disulfide Bonds in Placelet-derived Growth Eactor (PDGF) and Evidence for Agentia Activity of Monomeric PDGF, Fages 11260-11266, see entire document.  US, A, 4,959,314 (MARK ET AL.) 25 September 1990, see entire document.	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Station of descriment, with ladienties, where appropriate, of the rise and patients  WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1992, see cature document,  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 267, Number 16, issued 65 June 1992, M. Andersson et al., "Assignment of Interviain Disulfide Bonds in Placeleterived Growth Factor (PDGF) and Evidence for Agentiat Activity of Monomeric PDGF, Tages 11260-11266, see entire document.  US, A, 4,959,314 (MARK ET AL.) 25 September 1990, see entire document.	C. DOCUMENTS CONSIDERED TO 88 RELEVANT  C. DOCUMENTS CONSIDERED TO 88 DECEMBER TO 87, No. Andersson et al., "Assignment of 16, issued GS June 1992, M. Andersson et al., "Assignment of 16, issued GS June 1992, M. Andersson et al., "Assignment of 16, issued GS June 1992, M. Andersson et al., "Assignment of 16, issued GS June 1992, M. Andersson et al., "Assignment of 16, issued GS June 1992, M. Andersson et al., "Assignment of 16, issued GS June 1992, M. Andersson et al., "Assignment of 1600 and Evidence for Agonist Acciving of Monomeric PDGF;"  Figer 11260-11266, see entire document.  V. US, A, 4,9993-314 (MARK ET AL.) 25 September 1990, see entire document.	1		they documents are fisted in the continuation of Box C.	X Purd
WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1992, see catire document.  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 267, Number 16, issued G5 June 1992, M. Andersson et al., "Assignment of Interchain Disulfate Bonds in Platebet-derived Growth Factor (PDGF) and Evidence for Agonist Activity of Monomeric PDGF, pages 11260-11266, see online document.  US. A, 4,959,314 (MARK ET AL.) 25 September 1990, see entire document.	WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1992, see catize document.  WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1992, see catize document.  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 267, Number 186, issued 62 June 1992, M. Andersson et al., "Ansignment of Intervhain Distultide Bonds in Platelet-derived Growth Factor (POGF) and Evidence for Agents Activity of Monomeric PEGF, pages 11260-11266, see entire document.  US, A, 4,959,314 (MARK ET AL.), 25 September 1990, see entire Jocument.	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Tasken of descenses, with indication, where appropriate, of the rice-ann passages  WO, A, 92/11364 (PANG) 69 JULY 1922, see cature document.  WO, A, 92/11364 (PANG) 69 JULY 1922, see cature document.  In issued CS June 1992, M. Andersson et al., "Assignment of Interveban Dissultide Bonds in Platelet-derived Growth Eactor (PDGP) and Evidence for Agentst Activity of Monomeric PDGP;  Fages 11260-11266, see entire document.  US, A, 4,959,314 (MARK ET AL.), 23 September 1590, see entire Jocument.	mes data hear sensibled during the international search funne: POOF, diract, harmodinar, where prendicible, as a sea DACOC (Line 3, 153, 153, 153, 153, 153) search urmer: POOF, diract, harmodinar, ryander, estaturit, aparist.  DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Status of desonment, with indeadlon, whore appropriate, of the riderant passages  Chain of desonment, with indeadlon, whore appropriate, of the riderant passages  WO, A, 92/11364 (PANO) 09 JULY 1992, see cature document.  10 JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 267, Number 116, issued 65 June 1992, M. Anderstann et al., "Assignment of Interveban Distultion Bonds in Platelet-derived Growth Factor (POGF) and Evidence for Agonts Activity of Monomeric PDGF, pages 11260-11266, see entire document.  US, A, 4,959,314 (MARK ET AL.) 23 September 1590, see entire document.				
WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1992, see cature document, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 267, Number 16, issued 05 June 1992, M. Andersson et al., "Assignment of Interchain Distillide Bonds in Platelet-derived Growth Factor (PDGF) and Evidence for Agonist Activity of Monomeric PDGF; pages 11260-11266, see entire document.	WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1992, see catize document.  WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1992, see catize document.  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 267, Number 16, issued 60 June 1992, M. Andersson et al., "Ansignment of Interchain Distultion Bonds in Platelet-derived Growth Factor (POGF) and Evidence for Agonts Activity of Monomeric PIGGF, pages 11260-11266, see entire document.	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Challon of descenses, with indication, where appropriate, of the rice-ann passages  WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1922, see cature document.  1  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 267, Number 11 is, issued 08 June 1992, M. Andersson et al., "Ansignment of Intervebain Distultion Bonds in Platelet-derived Growth Factor (PDGF) and Evidence for Agents Activity of Monomeric PDGFP, pages 11260-11266, see entire document.	mes data hear sensibled during the international search funne: POOF, diract, honordenser, where prendicible, as a sea DACOC (Line 3, 153, 153, 153, 153, 153) search urmer: POOF, diract, honordenser, honordenser, y as Bedain, eatspraft, appropriate, or the richeaus patrops of Casalon of desonment, with indention, where appropriate, or the richeaus patrops of Casalon of desonment, with indention, where appropriate, or the richeaus patrops of Casalon of desonment, with indention, where appropriate, or the richeaus patrops of Casalon of Garantees, with indention, where appropriate, or the richeaus patrops of Casalon of Data of Casalon of June 1992, Ar. Anderstayon et al., "Assignment of Indertwism Distultion Bonds in Platelet-derived Growth Factor (POGF) and Evidence for Agonts Activity of Monomeric PIGGF, pages 11260-11266, see entire document.		September 1990, see entire	US, A, 4,959,314 (MARK ET AL.) 24 document.	<b>&gt;-</b>
WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1992, see eatire document.	WO, A, 92/1364 (PANG) 09 JULY 1992, see cutire document.	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Chashes of descenses, with indeation, where appropriate, of the relevant passages  WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1992, see entire document.	men data bear everationd during the international search fame: of data bear unit, where peredicable, as an and DACOG (time 5, 155, 351, 351, 357, 351) search terms: PPOPP, direct, beanofamer, bearodiner, sy. a. Bothin, ealestoring eposities, or peredicable, as DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  POPP  Estaton of decomment, with indeation, where appropriate, or the relevant passages  WO, A, 92/11364 (PANO) 09 JULY 1992, see castire document.	1 - 3 ,	STRY, Volume 267, Number Son et al., "Assignment of let-derived Growth Factor My of Monomeric PDGF,"	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMI; 16, issued OF June 1992, Nr. Anders Interchain Disulfide Bonds in Place (PDGF) and Evidence for Agonist Act pages 11260-11266, see entire documer	A. X
WO, A, 92/11364 (PANG) 09 IULY 1992, see cutire document.	Chalon of descenses, with befaulton, where appropriate, of the relevant passages WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1992, see cature document.	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Chalco of desonment, with indication, where appropriate, of the relevant paragraph of	min data beas swanshed during the international search funner of data beas unit, where peredicable, as and DIACOC (Line 5, 155, 251, 251, 251, 251) search turner. POOF, dinar, boanciener, bearediner, sy, Beduch, eathprafit, aparist.  DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Chaign of desonment, with indication, where appropriate, of the relevant passages  WO, A, 92/11364 (PANC) 09 JULY 1992, see cature document.	3,44			
	Chaton of document, with kedication, where appropriate, of the relevant passages	UMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT CRaden of december, with ladeation, where appropriate, of the relevant passages	Chaptrie data keu sensibad durkų be izernational seartė (tame si data base urd, where predicialis, search tama u AVS ased DIALOG (tibe 5, 155, 151, 157, 158) search tama: PCOF, dinse, bestvime, betweditoen, systalas, deals, Bedula, eaksprott, aprily.  C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Chaptry  Chaptry	1,2,8	992, sæ entire document.	WO, A, 92/11364 (PANG) 09 JULY 1	XX.
Dougenstaine search at older than radianum desenversation is the stant that sook document are included in the Boids searchers data bear semanhold during the instructional search (name of data bear unt, where practicals, search terms us obtain, a behalf, and yould, applie, and many POOF, dinner, bear dinner, systelms, daulistic, and yould, applie, and the terms of the	Documentation search of other than indicates described to the stant that mod documents are included in the Edde sear Electronic data bear semabled during the international search (tame of data bear unt, where preschable, search terms unt ATS and DIALOG (Like 5, 155, 151, 151, 151) scarch terms: PDOF, direst, bornofoner, bearediner, synction, duality, the bottom, and posity, openity.	Documentation seated other than raininum desermentation to the strent that soot documents are included in the Bolds sean			by elastification symbols) 7, 12; 590/350, 351, 399; 536/23.5	doomnerskion tearched (classification system fullowed 4357.2, 69.1, 69.4, 172.3, 240.2, 122.3, 320.3; 514	Minimum d U.S. :
William dormozanico tearbid (classificatios system füllared by classification syrchob)  U.S.: 43572, 69.1, 69.4, 172.3, 240.2, 122.3, 220.3; 5147, 12; 500150, 351, 399; 53623.5  Documentation search of other has minimum documentation to the stant that soot documents are included in the Bolide rest.  Retermine data base remarked during the international sounds (tame of data base and, where syredizable, search terms to AJS and DALAOG (Libs 1, 155, 351, 377, 339) scarch terms: PCOF, dines, bosnofizmer, belearching to the basis, Bochini, each gothis, and gothis, and gothis, and gothis, and gothis, and gothis, and gothis, Bochinia etc.	Minimum dominantene transhed (classification system (b)(overal by classification symbols)  U.S.: 415/72, 69.1, 69.4, 172.3, 240.2, 152.3, 252.1, 514.7, 15; 550/350, 351, 359; 536/23.3  Documentation searched other than minimum decommentation to the strent that such documents are broiteded in the failsi was received detables searched in the failsi was been able to the strength of the fails was bold of the fails of the fails of the search terms of data beau unit, where prendicible, search terms us AVS and DALAGO (class 5, 155, 351, 377, 359) search terms: PROF, class, beancinese, betaminger, synchro, duality, behalf, ask portly, app. 1991.	Minimum dormormens for tearlebs (classification system Guilowed by classification systemb) U.S.: 435/72, 60.1, 60.4, 172.1, 240.2, 152.1, 254.7, 12; 554050, 251, 399; 536/23.5 Documentation search of other than makinum desermentation to the estant that most documents in brothold in the folids sear	Minimum dopumentation tearrickal (clustification system Gülawed by clustification symbols) U.3. : 4357,2, 69.1, 69.4, 172.1, 240.2, 122.2, 202.1; 5147, 12; 590550, 331, 399; 53623.5		alonal chasilication and IPC	ASSIPICATION OF SUBJECT MATTER ASSISTANCE, 1770; CIEN 1500, 1512, 1518 (Please See Elity Men. Be belenmidond Please Christicasien (PC) of 10 does in 138 SCARCIED.	A. CLA US CL According
A. CLASSIPICATION OF SUBJECT MATTER DEGO: Addit software Control of SUBJECT MATTER DEGO: Addit software Control of SUBJECT MATTER DEGO: Addit software Control of SUBJECT MATTER DEGO: Additional Control of SUBJECT MATTER According to instructional Patent Citationacien (DC) or to both matteral catalization and PC  B. FIREIAN SEARCHED Minimum decontraction teached (classification system Sillowed by classification system) U.1. 4257.2, 50-1, 50-4, 172.1, 240.2, 252.1, 222.1; 5147, 12; 500350, 351, 139; 53623.3  Documentation search ad other than minimum decontraction to the extent that mod docutrons to brothold in the Exists was Alaxand data base searched during the international search (turns of data beas unit, where precipable, search turns of DOP, dines, bosocianse, betwardner, system, daditional, as a product of the position of the pos	A. CLASSIPCATION OF SUBJECT MATTER BEGG SAIS 3702, 3704C CLTM 1500, 1317, 1518 US CL. : Fleats Sav Event State. US : SASACHED.  B. Fleats Sav Event Sav. Minimum downwards on earthed (clearification pytem fullowed by clearification symbols) US : 43572, 69.1, 69.4, 1723, 240.2, 2523, 2223, 5147, 12, 390159, 351, 399; 33622.3 Downwardshies sentialed other than minimum downwardson to be strent than sood documents are included in the fields warringd ANS and DALAGO (clias 5, 155, 351, 377, 378) search turner: POOF, cliane, homodomer, where presented in the fields of chain, and poulty, apprile.	A. CLANSIPCATION OF SUBJECT MATTER BODG: AGENT AND A 2704, 2704 CITS 1500, 1317, 1518 BODG: AGENT SURVEY CONTROL OF CITS 1500, 1317, 1518 According to learnablead Place Charactering (DC) or to both national casalication and IPC B. FIREIDES SEARCHEED Minimum documentation to reached (classification system followed by classification symbols) U.1. 42572, 69.1, 69.4, 172.1, 240.2, 122.1, 320.1, 5147, 121, 5500550, 351, 199; 53623.5 Documentables searched other than minimum documentation to the extentithal seed documents are included in the fields restrict	A. CLASSIPICATION OF STRIECT MATTER BEGG ASSEX STRIED. CLOSSIVE SERVED STRIED. According to international Paint Charlifeation (PC) or to both rankend charlifeation and IPC B. WIELDS SEARCHED Minimum downwares on teached (charlifeation system skilowed by charlifeation symbols) U.S.: ASSETA: 60.1, 60.4, 1723, 202., 1223, 222.3, 221.5, 5147, 12; 550,525, 351, 399; 536,23.5	lleuba No. 50	`		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No. PCT/US93/04530

į	PCT/U352/04530	
C (Continuation),	фа), DOCUMRNTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Chalca of document, with indication, where appropriate, of the relevant pussages	Robovers to chim No.
<b>&gt;</b> -	US, A, 4,845,075 (MURRAY ET AL.) 04 July 1989, see entire document.	80-81
<b>&gt;</b>	US, A, 4,889,919 (MURRAY ET AL.) 26 Docember 1989, see entire document.	78-79
n' x	ONCOOENE, Volume 8, Number 3, issued March 1993, D.W. Maher et al., "Alanine mulagenesis of conserved residues in the platelet-derived growth fastor family; identification of residues necessary for dimerization and transformation," pages 533-541.	1-3,11-12, 16,21- 24, 28,47,50, 54-55
<b>⋈</b> ⊁	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Volume 8, Number 3, itsued March 1988, M.K. Smer et al., Identification of Nonessential Disulfide Bords and Altered Conformations in the *-Kis Protein, a Hornolog of the B Chain of Platelet-Derived Growth Factor," pages 1011-1018, see entire document.	80-81 1-3,11-12,16,21- 22,38,37,39,47,5 0,54,56- 61,65,67,69,72,7 4,76-77
4,¥	THE EMBO JOURNAL, Volume II, Number II, issued November 1992, C. Oefner et al., "Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB," pages 3921-3926, see entire document.	78-81
<b>&gt;</b>	SCIENCE, Volume 236, issued 05 June 1987, N.A. Gless et al., "The Role of Individual Cysteine Residues in the Structure and Function of the v-13 Gene Product," pages 1315-1318, see entire document.	1-3,11-12,16,21- 22,28,37,39,47,5 0,54,56- 61,65,67,69,72,7 4,76-77,80-81
<b>&gt;</b>	RIOCHTEMISTRY, Volume 30, Number 13, issued 02 April 1991, M. Jaumann et al. "On the Structure of Platelet-Derived Growth Factor AA: C-Terminal Processing, Epitopes, and Characterization of Cysteine Residues," pages 3303-3309, see entire document.	1-3,9-10,16- 18,28-29, 32- 53,62-64,66,68- 69,71,75, 78-79
P4 **	BIOCHEMISTRY, Volume 32, Number 9, issued 09 March 1993, M. Haniu et al., "Divulfide Bonds in Recombinant Human Phates-Derived Growth Factor BB Diner: Characterization of Intermolecular and Intramolecular Disulfide Linkages," pages 2431-2437, see entire document.	78-81

TEN PCT/ASA/210 (near invasion of section about (July 1992).

(06)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Vec 1 Observations where cortain thiese were found nasservable (Contains ton of tern 1 of fert sheet)
This improved report has not been established in respon of estable stains under Asticle 1703(s) for the following reasons:
<ol> <li>Chiza Non:         besure they return to subject matter not required to be searched by this Authority, earnely;</li> </ol>
<ol> <li>Clubra Nos:</li> <li>Desture they take to parts of the international application that do not comply with the presented requirement to such an ordered that no intensingful hiermateral search can be serrind out, specifically:</li> </ol>
3. [ ] Claims Nos.: bernass day are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and faith seitences of Falls 6.4(3).
Bex II Observations where welty of terrenties it becling (Confissation of him 2 of fact theet)
(Tapplane Practica) Picate See Eure Shoot.
1. 🔀 At all required additional search feat were timely paid by the applicant, this featurational search report covers all searchable claims.
2. The secretaria defines could be secreted without effort justifying as subfitional for, this Authority (it not in its payment of any sublitional fet.
<ol> <li>As only some of the required actitions search fees were through pull by the applicant, this sitematicnal search report covers only these claims for which fees were paid, specifically skiles Nos.</li> </ol>
4. No required additional search from were timely past by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the inversion first mentioned in the chims; it is covered by skins Nos.:
Remark on Protest  The saddiened sorted from were accompanied by the epileans's protest.  No protest recompanied the payment of additional search feet.

š	_	_	
E CE			
SCALL A			
TATION AND THE			

Catain 1-34, 59-44, and 78-84, drawn to FOOFP usagonias, a first composition, and a method of habibiting bloding. a first endhod of use, chausted in Case \$30,034, for example.) laterrational application No. PCT/US93/O4530 Claims 35.55 and 65-75, drawn to DNA mobeoles, verson, transformed han cells, and kies, chanifed in Class 306/203, for example. Chims 16-77, drawn in a mathod for cahasoing PDGF affects, classified in Class 4357.1, for assempla. Claims 56-58, drawn to a method for inhibiting adverse PDGP offices, classified in Class 51412, for example. 43572, 69.1, 69.4, 172.3, 240.2, 222.3, 320.1; 5300,50, 351, 399; 5142, 12; \$3673.5 BOX 8. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING The ISA food mulds dymism & Riems: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: US CL. : ż =

Form PCT/55A/210 (axirs sheet)(3uly 1992)a

フロントページの統定

F 觀別配号 庁内整理番号 Z 8615-4C 8318-4H C 1 2 N 5/10 15/09 //(C 1 2 P 21/02 C 1 2 R 1:91) (51)Int.Cl.<sup>6</sup> C O 7 H 21/04 C O 7 K 14/49

37/24 A 6 1 K 37/02 9455-4C 9455-4C

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP (72)発明者 パックストローム, グドルン

スウェーデン国 エス・751 25 ウプサ ラ (無番地)

(72)発明者 エングストローム,ウラ スウェーデン国 エス・751 24 ウプサ

(72)発明者 ヘルディン, カール・ヘンリック スウェーデン国 エス・751 25 ウプサ

ラ (無番地)

(72)発明者 ヘルマン,ウルフ スウェーデン国 エス・751 24 ウプサ

(72)発明者 オストマン,アルヌ スウェーデン国 エス・751 24 ウプサ

ラ (無番地)

ラ (無番地)

ラ (無番地)

(72)発明者 ウエスタマーク, ベングト スウェーデン国 エス・751 24 ウブサ ラ (無番地)